

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA
VETERINÁRIA

VARIAÇÃO DIÁRIA DA EXCREÇÃO UROFECAL DE
METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES EM PAPAGAIO
VERDADEIRO (*Amazona aestiva*)

ERIKA FRUHVALLD

Botucatu – SP
Novembro – 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA
VETERINÁRIA

VARIAÇÃO DIÁRIA DA EXCREÇÃO UROFECAL DE
METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES EM PAPAGAIO
VERDADEIRO (*Amazona aestiva*)

ERIKA FRUHVALLD

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-graduação da Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia –
Universidade Estadual Paulista “Julio de
Mesquita Filho” – UNESP – Campus
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Nome do Autor: Erika Fruhvald

Título: VARIAÇÃO DIÁRIA DA EXCREÇÃO UROFECAL DE METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES EM PAPAGAIO VERDADEIRO (*Amazona aestiva*)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Eunice Oba
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Dr. Ian Martin
Membro
Pós-doutorando do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 30 de novembro de 2012.

“Tu te tornas eternamente responsável
por aquilo que cativas”
Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela história linda que me permite viver.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – UNESP Botucatu e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade.

Ao professor João Carlos Pinheiro Ferreira pela orientação, ensinamentos e inspiração.

Aos professores Carlos Roberto Teixeira, Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt, Eunice Oba, Maria Denise Lopes, Silvia Mitiko e ao Ian Martin pela participação e auxílio no projeto e por contribuírem com sugestões e correções.

Ao professor Rupert Palme e ao Instituto de Bioquímica da Universidade de Medicina Veterinária de Viena – Áustria pela parceria e dosagem das amostras.

A todos do Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária pela boa relação e vontade em ajudar uns aos outros.

Aos funcionários do CEMPAS: Irineu, Renato e Georgete pelo auxílio e colaboração com o manejo das aves.

Aos residentes e amigos do CEMPAS: Alícia, Bruna, Guilherme, Marcelo e Ramiro por colaborarem para que o projeto fosse desenvolvido como planejado.

Aos companheiros de colheita noturna e processamento das amostras: Cíntia Rio Branco, Caroline Destro, Caroline Fujihara, Eduardo Trevisol e Wolff Marques Filho pela amizade, ajuda, apoio e dedicação.

Aos amigos e companheiros de república: Marilda e Carlos Renato pela ajuda diária.

Aos amigos e companheiros da área de Medicina de Animais Selvagens por todas as experiências trocadas, pelas dicas e ajudas ao longo da minha formação.

Ao meu casal de papagaio-verdadeiro Zico e Zeca, que muito me ensinaram com seus gritos diários, imitações, cantorias e eventuais bicadas doloridas ao longo dos últimos 20 anos.

À minha calopsita Fumaça que sofre de automutilação, despertando a vontade de melhorar o bem estar e diminuir os distúrbios comportamentais nessas aves.

Aos 22 “falantes” de A a Z, que foram objeto de estudo. Guardo um carinho especial de cada um, por terem sido tão agitados e felizes pela manhã, me animando após uma noite mal dormida.

Ao meu namorado Lucas, por muitas vezes, querer mais que eu, que me realize profissionalmente.

Aos meus pais por SEMPRE estarem ao meu lado, me ajudando a superar cada desafio – mesmo que em outra cidade – com palavras de conforto, exemplo de caráter e segurança, me dando força para seguir em frente.

A todos os amigos de verdade e familiares, que são muitos, por me incentivarem a todo instante para continuar a caminhada.

À FAPESP pelo auxílio financeiro concedido, permitindo a realização desse projeto.

À Capes pela bolsa concedida.

À Biotron® pelo fornecimento das rações.

A todos, meu muitíssimo obrigada!

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Medianas (p25-p75) das dosagens dos metabólitos de glicocorticoides (ng/g) nas excretas de 12 machos, 10 fêmeas e dos 22 indivíduos totais de papagaios verdadeiros (<i>Amazona aestiva</i>), colhidas a cada três horas por 24 horas.	27
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ordem de pipetagem das soluções em placa de poliestireno contendo 96 poços, para realização de EIA. NSB – Ligação não-específica, apenas a solução de ensaio; BO – Padrão valor zero. S1 a S7 – Curva padrão, padrões para cada ensaio; Px – Controle de baixa concentração; Py – Controle de alta concentração; 1 a 35 – Amostras. (Fonte: Möstl e Palme, 2008) 23
- Figura 2 – Boxplot da variação diária de metabólitos de glicocorticoides (ng/g de excretas) de machos de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*). As respectivas medianas aparecem como linhas nas caixas. Círculos brancos correspondem a valores atípicos. 28
- Figura 3 – Boxplot da variação diária de metabólitos de glicocorticoides (ng/g de excretas) de fêmeas de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*). As respectivas medianas aparecem como linhas nas caixas. Círculos brancos correspondem a valores atípicos. 28
- Figura 4 – Boxplot da variação diária de metabólitos de glicocorticoides (ng/g de excretas) de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*). As respectivas medianas aparecem como linhas nas caixas. Círculos brancos correspondem a valores atípicos. Estrelas acima das barras de variação, significa diferenças significativas em relação ao intervalo de 5 a 8 horas da manhã ($p < 0,05$)..... 29

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Identificação no estudo, sexo, peso e identificação de origem dos animais utilizados no experimento. Animais provenientes de apreensão e doados pelo Parque Estadual do Tietê (PET), Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) e Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros" – Sorocaba (número). Todos os animais estavam alocados no CEMPAS – Botucatu desde 2008.	48
Anexo B – Descrição da composição básica e níveis de garantia da ração extrusada para psitacídeos de grande e médio porte – Papagaio Mix Biotron® - utilizada para alimentar as aves durante o experimento.	49
Anexo C – Foto da disposição das gaiolas. Placas (azuis) posicionadas em cada gaiola a fim de proporcionar sombra aos animais, durante a manhã, pois as gaiolas estavam voltadas para o nascer do Sol.	50
Anexo D – Foto de um dos indivíduos em postura de descanso. Apoio em apenas um dos membros e postura encorujada.	51

LISTA DE ABREVIATÖES E SIGLAS

ACTH = Hormônio adrenocorticotrófico

AVP = Vasopressina

cm = Centímetro

CRH = Fator liberador de corticotropina

DNA = Ácido desoxirribonucleico

EIA = Enzimoimunoensaio

g = Grama

GCs = Glicocorticoides

IUCN = International Union for Conservation of Nature

m = Metro

mbar = Milibar

mL = Mililitro

ng = Nanograma

nm = Nanômetro

NSQ = Núcleo supraquiasmático

PCR = Polymerase Chain Reaction

pg = Picograma

PVN = Núcleo paraventricular

RENTAS = Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres

TRF = Fator de liberação da tireotrofina

x g = Gravidade

µL = Microlitro

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ANEXOS	ix
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	x
RESUMO	x
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	5
REVISÃO DE LITERATURA	7
1 Papagaio-verdadeiro – <i>Amazona aestiva</i>	8
2 Ritmos circadianos	10
2.1 Melatonina	10
2.2 Glicocorticóides (GCs)	11
2.3 Níveis basais de GCs em mamíferos e aves	13
3 Influência dos estágios de vida e na reprodução	16
MATERIAL E MÉTODOS	18
1 Animais	19
2 Experimento. Dosagem urofecal de metabólitos de glicocorticoides para estabelecer seu perfil diário em Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)... ..	21
2.1 Delineamento experimental	21
2.2 Processamento das amostras	21
3 Análise estatística	25
RESULTADOS	26
DISCUSSÃO	31
CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	39
ANEXOS	47
ARTIGO	52

Fruhvald, E. **VARIAÇÃO DIÁRIA DA EXCREÇÃO UROFECAL DE METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES EM PAPAGAIO VERDADEIRO (*Amazona aestiva*)**. Botucatu, 2012, 74f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

RESUMO

As aves da família Psittacidae são muito visadas pelo tráfico de animais selvagens. O papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) é uma das espécies mais traficadas. Os animais provenientes do tráfico são transportados em espaço restrito, sem alimento ou água e as aves adoecem ou morrem devido ao estresse ou brigas, antes mesmo de chegarem ao consumidor final. O estresse leva a secreção de glicocorticoides que possui diversas funções nos vertebrados além de sofrerem flutuações dos seus níveis basais para preparar o organismo para o início das atividades diárias. Fatores ambientais e necessidades fisiológicas interagem para a manutenção do relógio biológico, que é responsável por determinar essas alterações endócrinas. As análises hormonais através de técnicas não-invasivas têm sido usadas em estudos da biologia da conservação, comportamentais e fisiológicos em aves cativas ou de vida livre devido a sua facilidade de coleta e por não causarem prejuízos ao indivíduo. Os níveis de metabólitos de glicocorticoides presentes nas excretas refletem as concentrações plasmáticas desses hormônios. Com objetivo de determinar o perfil de excreção urofecal de metabólitos de glicocorticoides nos excrementos de *A. aestiva*, ao longo do dia e relacionar esses achados com as atividades diárias desses animais, foram utilizados 22 animais (12 machos e 10 fêmeas) alojados em gaiolas individuais, e suas excretas foram colhidas a cada três horas, por 24 horas consecutivas. Foi observado um pico nas concentrações de metabólitos de glicocorticóides nas primeiras horas do dia, quando também se inicia as atividades diárias das aves; e as concentrações diminuíram gradualmente até atingirem seus níveis basais no final da tarde e se mantiveram baixos até a manhã seguinte.

Palavras-chave: atividade diária, corticosterona, excretas, ritmo circadiano, método não-invasivo.

Fruhvald, E. **DAILY VARIATION EXCRETION OF GLUCOCORTICOID METABOLITES IN BLUE-FRONTED PARROT (*Amazona aestiva*) DROPPINGS.** Botucatu, 2012, 74f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The birds of the Psittacidae family are highly targeted for wildlife trafficking. The Blue-fronted parrot (*Amazona aestiva*) is one of the most trafficked species. The animals are transported in restricted spaces, without food or water and the birds get sick or die due to stress or fights, before arriving to the final consumer. Stress leads to secretion of glucocorticoids that has several functions in vertebrates and suffer fluctuations of baseline levels to prepare the organism for the start of daily activities. Physiological and environmental factors interact to maintain the biological clock, which is responsible for determining these endocrine changes. The hormonal assays employing non-invasive techniques have been used in studies of conservation biology, behavioral and physiological studies of captive or free-living birds because of the ease of collection and lack of harm to the individual. Levels of glucocorticoid metabolites in feces reflect plasma concentrations of these hormones. In order to define the profile of excretion of glucocorticoids metabolites in *A. aestiva* droppings throughout the day and correlate these findings with the daily activities of these animals, we used 22 animals (12 males and 10 females) housed individually in cages, and their droppings were collected every three hours for 24 consecutive hours. A peak in the concentration of glucocorticoids metabolites was observed in the first hours of the day at the start of the birds' daily activities, and the concentrations decreased gradually to basal levels in the late afternoon and remained low until the next morning.

Key-words: daily activity, corticosterone, dropping, circadian rhythm, non-invasive method.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A prática da retirada dos animais selvagens de seu habitat para torná-los cativos pelo homem vem desde a Antiguidade. Nos seus primórdios, os espécimes eram capturados e utilizados para fins militares, como auxiliares em atividades de caça ou exibidos em paradas militares e em volta dos palácios. Havia também a promoção de batalhas entre animais selvagens e domésticos, por puro prazer (LIVET, 2001).

No século XVI, esses animais começaram a ser usados como presentes diplomáticos ou objeto de troca entre os países europeus, tornando-se assim produtos de comércio. Grandes expedições foram organizadas a fim de conseguir animais raros de outros territórios. Com a alta mortalidade dos animais, devido ao transporte inadequado e a aclimação difícil, os custos eram bastante elevados e limitavam a posse dessas raridades à alta aristocracia; manter esses animais enjaulados era sinônimo de riqueza e poder (LIVET, 2001).

Atualmente, os animais selvagens são visados para criação doméstica não convencional. Dentre os animais selvagens mais procurados para este fim, estão as aves, mais especificamente pássaros canoros, pelos seus belos cantos e aves da família Psittacidae, por possuírem a capacidade em imitar a voz humana. Hoje, muitas espécies de papagaios estão ameaçadas ou perto à extinção, como por exemplo papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*), papagaio-chauá (*Amazona rhodocorytha*), papagaio-charão (*Amazona petrei*) e o papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) devido à exploração pelo tráfico ou destruição de seus habitats (SCHERER-NETO et al., 2011).

A espécie *Amazona aestiva* (Linnaeus, 1758), popularmente conhecida como papagaio-verdadeiro, pertence à família Psittacidae, da Ordem Psittaciformes, a qual possui cerca de 360 espécies de aves no mundo. O Brasil possui a maior diversidade; cerca de 80 espécies em todo seu território (O'MALLEY, 2005).

Segundo o relatório do RENTAS (2001) os animais provenientes do tráfico são transportados em espaço restrito, sem alimento e água, em caixas

superlotadas, favorecendo brigas, ferimentos e que as aves adoeçam ou morram antes mesmo de chegarem ao consumidor final.

Diversas pesquisas em busca de dados básicos sobre a biologia da espécie vêm sendo desenvolvidas, visando estabelecer programas de conservação, recuperação de espécies ameaçadas de extinção, reprodução e melhoria de suas condições em cativeiro (ICMBio/MMA, 2011) evitando assim o estresse que prejudica sua saúde, comportamento e compromete seu bem-estar.

O estresse leva a liberação de glicocorticóides (GCs) plasmáticos, portanto a dosagem de suas concentrações vem sendo utilizada para avaliar a resposta ao estresse em diferentes espécies (SAPOLSKY et al., 2000; ROMERO, 2004; KORTE et al., 2005; TOUMA e PALME, 2005) e esclarecem as relações entre esses hormônios e o comportamento, estresse, bem-estar animal e fisiologia reprodutiva. Essas informações vêm sendo usadas para o desenvolvimento dos conceitos de ecologia comportamental e estratégias dentro da área de biologia da conservação (ROMERO, 2004).

A dosagem dos GCs pode ser realizada no plasma e soro sanguíneos saliva e dos seus metabólitos nas fezes ou urina; no caso das aves, como a excreção é conjunta, pode ser feita nos excrementos urofecaís (BEERDA et al., 1996; COOK, 2002; WASSER et al., 2002).

Contudo as técnicas de colheita de sangue nos animais selvagens são complicadas, altamente invasivas e inadequadas para avaliar os hormônios do estresse (ROMERO e REED, 2005), pois elevam rapidamente os níveis sanguíneos desses hormônios, além de prejudicar a saúde e o bem estar animal (BOONSTRA, 2004).

Devido a isso, as técnicas não invasivas de avaliação desses hormônios vêm sendo desenvolvidas e validadas em várias espécies como camundongos (TOUMA et al., 2004), ratos de laboratório (BAMBERG et al., 2001), cães e gatos (SCHATZ e PALME, 2001), bovinos e ovinos (PALME et al., 1999), gansos (KOTRSCHAL et al., 2000) e galinhas (RETTENBACHER et al., 2004).

Dentro deste cenário, Fujihara (2012) validou a dosagem de metabólitos de GCs (corticosterona) em excrementos de papagaio verdadeiro, tornando portanto esta técnica não invasiva disponível para o estudo do funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal na espécie.

Contudo, apesar de no seu experimento ter sido dosada ao longo do dia a excreção de metabólito de GCs nas excretas de animais que não foram submetidos a desafios hormonais, esses valores necessitaram ser confirmados pois o grupo controle e o grupo solução salina tiveram resultados parecidos, podendo levar a interpretação que a resposta ao estímulo visual e auditivo é a mesma da contenção física, já que o grupo controle permanecia no mesmo ambiente que os animais que foram contidos e submetidos a injeções das substâncias testadas (ACTH, solução salina e dexametasona) (FUJIHARA, 2012).

Fatores externos (ambiente) e internos interagem para a manutenção do relógio biológico, que é responsável por determinar alterações endócrinas. Esse relógio biológico é determinado por um ciclo de sono e vigília calibrado ao ciclo noite- dia do Planeta Terra (FERNANDES, 2006).

Um dos hormônios responsável pela manutenção do relógio biológico (ciclo vigília-sono) é a melatonina, que sofre influência da luminosidade ambiental. O fator de liberação da corticotropina (CRH) é importante para a manutenção da fase de vigília, sendo responsável pela liberação de GCs. Nas primeiras horas da manhã há aumento da secreção de cortisol, pois há necessidade do aumento do metabolismo para a iniciação das atividades do dia e então aumentar a glicemia e disponibilizar a glicose às células (FERNANDES, 2006; MARTINEZ et al., 2008).

Devido a essas variações fisiológicas das concentrações de GCs sanguíneos e, conseqüentemente, dos níveis de metabólitos presentes nas excretas, é importante que se conheça as variações circadianas desses hormônios para que sejam evitados equívocos na interpretação dos resultados.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo foram determinar o perfil de excreção urofecal de metabólitos de glicocorticoides nos excrementos de *Amazona aestiva* ao longo do dia e relacionar esses achados com as atividades comportamentais diária desses animais e seus níveis plasmáticos.

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

1 Papagaio-verdadeiro – *Amazona aestiva*

Os papagaios-verdadeiros são psitacídeos de porte médio, não possuem dimorfismo sexual, pesam em média 400 gramas e medem 37 cm de comprimento. Sua coloração é predominantemente verde, cabeça amarela, fronte e loros azuis e pés e bico pretos (FORSHAW, 1989).

Taxonomicamente essa espécie pode ser dividida em duas subespécies: *Amazona aestiva aestiva* que se caracteriza pelas penas do encontro das asas vermelhas e ocorre no Brasil oriental, e *Amazona aestiva xanthopteryx* que possui as penas do encontro das asas amarelas, que ocorre no Brasil ocidental, Bolívia, Paraguai e Argentina. Na região central do Brasil, há sobreposição entre essas duas subespécies, e os animais apresentam coloração mista no encontro das asas (DARRIEU, 1983).

Os psitacídeos têm por características uma rinoteca curva de base larga, pregueada internamente, e língua grossa, lisa e arredondada, sendo úteis na trituração de duras sementes e frutas. Essa característica anatômica os torna potentes em destruir plantações e por isso, são caçados pelos agricultores. Além disso, essa anatomia os permite pronunciar sons similares aos da linguagem humana, o que desperta interesse no mundo inteiro, sendo o grupo que mais sofre com o tráfico de animais selvagens (COLLAR e JUNIPER, 1992; SICK, 2001; GODOY, 2007)

Através de estudos genéticos, observou-se elevada diferenciação entre as populações da espécie *A. aestiva*, sendo por isso classificada pela IUCN (2011) como de “menor preocupação” para o risco de extinção. Contudo, Leite (2007) relata que essas informações devem ser interpretadas com cuidado, pois os fatores de alta longevidade da espécie (acima de 50 anos) e, portanto, o longo período necessário para se observar as perdas genéticas (várias gerações), podem camuflar a ameaça de extinção.

A maioria dos Psittaciformes são monogâmicos. Na estação reprodutiva, primavera-verão, formam casais isolados, estabelecendo ninhos em cavidades

de árvores (FERNÁNDEZ-JURICIC et al., 1998). Produzem ovos de casca branca, pois não tem a necessidade de camuflar seus ovos, facilitando assim, o manejo destes pelo casal, dentro do ninho escuro (ALLGAYER e CZIULIK, 2007).

Os papagaios do gênero *Amazona* atingem a maturidade sexual em média aos 5 anos de idade (ABRAMSON et al., 1995). Quando pareados, os animais ficam próximos um do outro no poleiro, tocam seus bicos e oferecem alimento um ao outro. O macho tem sua agressividade aumentada na época reprodutiva e barulhos estranhos, pessoas ou mesmo animais dominantes da mesma espécie em contato visual, inibem o par a copular ou fazer a postura. No cativeiro, em viveiros coletivos é comum o pareamento de aves do mesmo sexo – homossexualismo (ALLGAYER e CZIULIK, 2007).

Fora da época reprodutiva, os indivíduos agrupam-se em bandos. Quando amanhece vocalizam antes de voarem dos locais em que descansam para áreas de alimentação e, ao entardecer, realizam o caminho reverso e vocalizam como um cumprimento ou uma chamada a cada membro para que retorne ao grupo. Ainda podem vocalizar ao se distanciar fisicamente do companheiro, de forma a manter o contato auditivo (FERNÁNDEZ-JURICIC et al., 1998; BERGMAN e REINISCH, 2006).

Os papagaios gastam grande parte do tempo da fase de vigília limpando suas penas ou de seus companheiros do bando (*grooming* social). O *grooming* só ocorre se a ave não se sentir ameaçada. A manutenção das penas é essencial para o voo, termorregulação, impermeabilização, camuflagem e comunicação entre os indivíduos, principalmente na época reprodutiva (BERGMAN e REINISCH, 2006).

2 Ritmos circadianos

2.1 Melatonina

O núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo é o centro responsável por adequar o organismo dos mamíferos ao ciclo circadiano (do latim: *circa* = em torno de; *dies* = do dia; HASTINGS e HERZOG, 2004). Essa área do hipotálamo, localizada junto ao nervo óptico, recebe estímulos da retina que informam o organismo sobre a existência de luz. Na ausência da luz, a glândula pineal é estimulada pelo NSQ a secretar melatonina (um dos principais neuro-hormônios responsáveis pela cronobiologia do ciclo vigília-sono), transformando uma informação fótica em estímulo químico a todas as células (FERNANDES, 2006; MARTINEZ et al., 2008).

Em aves, estudos têm verificado que o hipotálamo médio-basal (que inclui o infundibulum, núcleo hipotalâmico inferior e a eminência mediana) tem maior expressão de genes responsáveis pela regulação do relógio biológico, comparado ao núcleo supraquiasmático (YASUO et al., 2003).

A melatonina é secretada em um padrão programado, que sofre influência da luminosidade ambiental e seu pico ocorre nas primeiras horas da noite. Este pico é um dos primeiros estímulos para o sono (FERNANDES, 2006).

O ciclo biológico poderá ser alterado dependendo da exposição à luz que o indivíduo é submetido. Sendo assim, no caso de um indivíduo de hábitos diurnos, submetido à luz intensa no final da tarde, haverá um atraso de seu relógio biológico e, se a luz for intensa no início da manhã, adiantará seu relógio (HOROITZ et al., 2001). Porém o ciclo vigília-sono é definido por um sistema neuroquímico e funcional complexo, no qual desajustes abruptos requerem um tempo de adaptação às mudanças impostas por novos hábitos ou por grandes mudanças de fusos horários (MARTINEZ et al., 2008).

Gwinner et al. (1993) avaliaram os níveis de melatonina em aves ao longo do ano. Obtiveram os níveis mais altos durante a noite, o que demonstra seu importante papel na regulação do ciclo vigília-sono em aves. Em outro estudo, foram comparados níveis de melatonina antes, durante e depois do período de migração, fase em que há atividade noturna, em *Sylvia atricapilla*. Foi

observado durante a fase migratória que as aves apresentaram níveis de melatonina menores do que nas fases anteriores e posteriores à migração (FUSANI e GWINNER, 2005).

Além da luminosidade, o calor do dia, redução da temperatura ambiental à noite, as variações de incidência de luz durante o dia, os sons das cidades e de animais (galo, pássaros, etc.) são elementos que condicionam o indivíduo a manter um ritmo de atividade alternada com repouso, em um padrão circadiano (FERNANDES, 2006).

Outros hormônios e neurotransmissores também têm sua secreção vinculada ao ciclo vigília-sono, facilitando o estado de vigília ou de sono. Neuro-transmissores, como o CRH e o fator de liberação da tireotrofina (TRF), são importantes para a fase de vigília. Nas primeiras horas da manhã, em humanos, há aumento da secreção dos hormônios tireoideanos, de cortisol e de insulina, seja por aumento da taxa metabólica para a iniciação das atividades do dia, ou indiretamente pelo aumento da glicemia e da utilização de glicose pelas células (FERNANDES, 2006; MARTINEZ et al. 2008).

2.2 Glicocorticóides (GCs)

Níveis de GCs plasmáticos variam ao longo de 24 horas. Em animais diurnos, as concentrações de GCs plasmáticos aumentam pela manhã, e em noturnos, no começo da noite (ROMERO, 2002).

Também há aumento das concentrações de GCs plasmáticos quando há estímulos externos como numa perseguição ou na presença de um predador, ou em estímulos internos, por exemplo, a fome. Esses estímulos ativam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal preparando o organismo para a luta, fuga ou procura por alimento (SEYLE, 1973; DALLMAN et al., 1993).

Ainda, esses estímulos, ativam o sistema neuronal, aumentando a pressão sanguínea arterial, o tônus muscular e a frequência respiratória. O sistema endócrino também é ativado a fim de disponibilizar energia elevando a glicose plasmática. Essas alterações estimulam o catabolismo celular, responsável por mobilizar energia, que é induzido pelos hormônios como a epinefrina, norepinefrina e glicocorticoides, em detrimento do anabolismo

celular (responsável pela reparação, cicatrização e crescimento) que é induzido pelos esteroides sexuais e hormônios de crescimento (BOONSTRA, 2004; LUNDBERG, 2005).

A liberação de GCs é feita pela córtex da adrenal após estímulo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. A secreção de GCs (cortisol na maioria dos mamíferos e corticosterona em aves, répteis e anfíbios) ocorre em resposta a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) proveniente da hipófise anterior, que por sua vez, é estimulada pelo CRH e a vasopressina (AVP) derivados de neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo (BOONSTRA, 2004; ROMERO, 2004).

Quando os estímulos cessam, é reestabelecido o equilíbrio dinâmico pela retroalimentação que os GCs exercem nos receptores no hipotálamo e na adenohipófise levando a redução da produção de CRH e ACTH e, consequentemente, redução da produção de GCs (CARSIA e HARVEY, 2000).

A metabolização dos GCs é feita pelos rins, que excretam os metabólitos pela urina; e pelo fígado, onde os metabólitos são carregados junto à bile, armazenados na vesícula biliar e finalmente excretados pelas fezes. O tempo de passagem do alimento pelo intestino vai influenciar diretamente no período entre a secreção plasmática e a excreção fecal (MÖSTL e PALME, 2002).

Assim como em mamíferos, a síntese de glicocorticóides em aves é dependente do estoque de colesterol. O principal glicocorticóide produzido pela glândula adrenal das aves é a corticosterona, formada a partir da hidroxilação do carbono 11 da 11 β -desoxicorticosterona pela enzima 11 β -hidroxilase (CYP11B2). Sua representação molecular é C₂₁H₃₀O₄ (CARSIA e HARVEY, 2000).

A resposta aos estímulos e os níveis hormonais variam conforme os fatores ambientais e a atividade reprodutiva. Devido a isso, é necessário provar que a concentração dos hormônios dosados refletem o estado fisiológico em que o indivíduo se encontra, para se obter uma correta interpretação dos resultados (MÖSTL et al., 2005).

Uma das técnicas para se conhecer essas respostas é o desafio experimental com administração de hormônios exógenos que induzam a excreção ou provocam a inibição do hormônio o que se pretende dosar (TOUMA e PALME, 2005).

Fujihara (2012) validou a dosagem de metabólitos de GCs em excretas de papagaios-verdadeiros empregando o desafio com ACTH. Também validou a metodologia da dosagem por meio da técnica de Enzimoimunoensaio Direto, empregando o anticorpo imunomarcado Cortisona. Nesse estudo, os animais que receberam ACTH intramuscular, apresentaram elevações das concentrações de metabólitos de GCs nas excretas colhidas a partir das primeiras três horas após o desafio. O aumento se manteve até nove horas pós-desafio e o pico de excreção foi observado entre três e seis horas. Como tratamentos de controle, os animais receberam injeção do mesmo volume de solução salina ou foram mantidos sem manipulação, apesar de permanecerem no mesmo ambiente dos demais que foram submetidos aos procedimentos já citados. Nesses animais, foi observado um padrão de variação que sugere a existência de um ritmo circadiano de excreção de metabólitos de corticosterona.

2.3 Níveis basais de GCs em mamíferos e aves

A periodicidade diária da atividade adrenocortical ocorre em diferentes espécies. Em mamíferos, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal tem um pico de atividade no começo da fase ativa e assim se mantém por várias horas, uma vez que os níveis de GCs são os responsáveis por regular a utilização de energia (DALLMAN et al., 1993).

Em camundongos e ratos, que são animais de hábitos noturnos, os níveis de corticosterona plasmáticos aumentam no início da fase escura, e diminuem ao longo da noite, chegando a níveis mais baixos antes do amanhecer (MCCARTHY et al., 1960; MALISCH et al., 2008).

Em animais de hábitos diurnos, o padrão circadiano para glicocorticoide plasmático é invertido. Migeon et al. (1955) observaram um pico de 17-hydroxycorticosteroides plasmático, precursor do cortisol, em macacos rhesus (*Macaca mulatta*) às seis horas da manhã, com queda ao longo do dia e atingindo os menores valores às nove horas da noite, horário em que os animais se abrigavam para o descanso noturno.

Nas aves, é observado um padrão de semelhante secreção de GCs. Em pardais (*Zonotrichia leucophrys gambelii*) foi demonstrado por Breuner et al. (1999) um padrão diário de secreção de corticosterona plasmática, que apresentou níveis basais ao longo do período ativo, e um pico de corticosterona no final da fase inativa, antes de amanhecer. Em *Z. albicollis* também foi observado esse padrão de secreção de corticosterona plasmática após o término da fase de migração (DUSSEAU e MEIER, 1971).

Westerhot et al. (1994) observaram aumento na concentração de corticosterona plasmática de pombas (*Columba livia domestica*) uma hora antes do início do fornecimento de luz, mesmo quando invertido o fotoperíodo através de fornecimento de luz artificial.

Em um estudo realizado em chapim-azul (*Parus major*) foi observado pico de metabólitos de GCs nas excretas ao longo do dia, por volta das nove horas da manhã, quando o fotoperíodo já havia se iniciado. Os níveis hormonais diminuíram rapidamente e se mantiveram baixos o resto do dia. Pelo tempo de excreção dos metabólitos, o pico de GCs plasmáticos ocorreu durante ou no final da fase noturna do ciclo noite-dia (CARERE et al., 2003).

Os níveis basais de GCs podem ser influenciados por vários fatores que alteram a periodicidade da atividade adrenocortical diária. Entre esses fatores destacam-se a presença de agentes estressores, condições ambientais, existindo ainda variações relacionadas ao sexo (TOUMA e PALME, 2005).

Quando o indivíduo está em contato com o estressor a algum tempo, há uma adaptação endócrina aquela situação, apesar do comportamento frente ao estressor permanecer. Foi observado em ratos, quando expostos ao odor do gato, aumento significativo dos níveis de corticosterona plasmática associado ao comportamento em evitar a fonte do odor na primeira exposição, porém após cinco exposições, não apresentaram mais as alterações endócrinas, mas seu comportamento em evitar a fonte do odor se manteve (FILE et al., 1993).

Müller et al. (2007) encontraram diferenças nos níveis plasmáticos de corticosterona entre duas populações de Chapim-azul (*Parus caeruleus*), uma que habita o continente (Sul da França) e a outra a Ilha de Córsega. Esses autores demonstraram com o estudo que há possibilidade da adaptação dessa ave às condições impostas pelo ambiente, pois na Ilha, havia menos

predadores e competições interespecíficas, ocasionando menores níveis plasmáticos de corticosterona nessa população.

Foi observado em pardais (*Zonotrichia leucophrys gambelii*) uma melhor resposta ao estressor no começo da fase ativa diária do animal, em que houve o pico de GCs. Dessa forma, variações diárias na sensibilidade da resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal podem regular as respostas fisiológicas e comportamentais para estressores durante o ciclo de 24 horas e conseqüentemente, afetar a sobrevivência de um animal de vida livre em seu habitat natural (BREUNER et al., 1999).

Ainda em pardais (*Z. leucophrys gambelii*) foi observado maiores concentrações de GCs plasmáticos em machos comparados com as fêmeas, durante a época reprodutiva, contudo, no inverno essas diferenças não apareceram (ASTHEIMER et al., 1994).

Houve diferença no padrão de excreção de metabólitos de corticosterona entre machos e fêmeas de corujas (*Strix occidentalis caurina*). Essa diferença parece estar associada ao grau de perturbação de seu habitat. Machos de vida livre apresentaram níveis maiores metabólitos de corticosterona quando houve exploração florestal. Provavelmente essa resposta aconteceu devido a sua função de proteção do território. Foi observado também o aumento da excreção de corticosterona no começo da estação reprodutiva, época que ocorre a nidificação e o acasalamento, com declínio das concentrações de metabólitos de GCs logo depois. Já as fêmeas apresentaram níveis relativamente baixos nessa época e um aumento das concentrações de metabólitos de corticosterona na fase de cria, provavelmente por serem responsáveis pelos cuidados parentais (WASSER et al., 1997; WASSER e HUNT, 2005).

3 Influência dos estágios de vida e na reprodução

A resposta a estímulos ambientais e sociais determina o início e a duração do estágio do ciclo da vida do animal. Apenas um evento futuro previsível (por exemplo, o aumento do fotoperíodo na primavera) poderá ser necessário para desencadear a atividade reprodutiva nas aves. Porém, se acontecerem eventos imprevistos (estressores), como escassez de ninho pelo desmatamento ou presença de predador, o animal precisará responder a esses estímulos para coordenar os ajustes necessários para a reprodução com as mudanças ambientais (WINGFIELD e SILVERIN, 2009).

O estresse pela presença de um predador ou a competição por alimento são fatores que podem influenciar no sucesso reprodutivo. Em pardais (*Melospiza melodia*) foi avaliada a relação da disponibilidade de alimento e a presença de predador. Os animais que tiveram alimento disponível e pouco contato do predador obtiveram quase o dobro do sucesso reprodutivo dos animais dos grupos controles – ausência de alimento e pouco contato com o predador (SEYLE, 1973; ZANETTE et al., 2003).

Esses fatores que não são esperados (escassez do alimento, presença do predador) podem ser tão estressantes para determinadas espécies que poderão sofrer efeitos deletérios prejudicando a diversidade e estabilidade populacional (WINGFIELD, 2008).

Várias espécies apresentam variação dos níveis de GCs plasmáticos em resposta as estações do ano e aos estágios de ciclo de vida. Na época reprodutiva os níveis plasmáticos aumentam. Esse fenômeno provavelmente evoluiu para atender aumentos previsíveis do metabolismo, que por consequência requer maior demanda energética (ROMERO, 2002).

Em estorninhos não foi observado diferença entre os níveis basais de corticosterona em dias de maior fotoperíodo, comparados aos dias curtos, porém, durante a muda de penas, os níveis de corticosterona foram mais baixos (ROMERO e REMAGE-HEALEY, 2000).

Em pardais (*Zonotrichia albicollis*), Dusseau e Meier (1971) dosaram ao longo de 24 horas, níveis plasmáticos de corticosterona durante os quatro estágios de vida das aves: inverno, muda pré-nupcial, primavera (fase de

migração) e muda pós-nupcial. No inverno foram observados níveis de corticosterona bem mais altos do que em outros períodos analisados. Também foi verificado um pico de GCs no início da fase de escuro, que sugere que a queda da temperatura exige maior demanda metabólica para produzir calor durante a noite.

O organismo das aves migratórias sofrem mudanças para prepará-la para o período de migração. Uma delas é o acúmulo de gordura, como reserva de energia. A utilização dessa energia durante a migração favorece a manutenção de níveis altos de GCs durante essa fase e, diminuem logo após o seu término (WINGFIELD e SILVERIN, 2009).

Porém, há espécies ou situações que apesar do requerimento energético ser alto, não necessariamente altera as concentrações hormonais. Um exemplo é estudo de Jenni-Eiermann et al. (2009) em aves migratórias seixoeira (*Calidris canutus*) nas quais não foi encontrado aumento de corticosterona plasmático após serem submetidas a um voo longo.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1 Animais

Foram utilizados 22 papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*), sendo 10 fêmeas e 12 machos, com peso de $417,6 \pm 48,5$ g (média $\pm$ desvio padrão), pertencentes ao Centro de Manejo e Pesquisa de Animais Silvestres (CEMPAS) da FMVZ-UNESP Botucatu (Anexo A). Esses animais foram doados ao CEMPAS por instituições como Fundação Parque Zoológico de São Paulo e Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros” devido a superlotação desta espécie, pelo grande número de apreensões no comércio ilegal dessas aves.

As aves estavam separadas previamente por sexo, em dois grupos, cuja sexagem foi realizada pela técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”), utilizando protocolo de extração do DNA descrita por Sambrook e Russell (2001), no Laboratório de Biologia Molecular Animal do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UNESP, Campus Botucatu.

Os animais passaram por um período de adaptação; foram capturados, pesados, examinados clinicamente e abrigados em gaiolas individuais 30 dias antes do início do experimento (5 de julho a 4 de agosto de 2010). Durante esse período, as frutas e sementes foram retiradas da alimentação dos animais e, introduzida uma ração comercial extrusada (BIOTRON® - Anexo B) para psitacídeos de grande e médio porte e água *ad libitum*.

Os machos foram colocados nas gaiolas superiores e as fêmeas nas inferiores, estas a 30 cm do chão. As gaiolas eram de metal, mediam 100 x 50 x 50 cm (largura x altura x profundidade), com poleiros, comedouros e bebedouros instalados igualmente, alocadas em um solário telado por toda sua volta, metade coberta por telhas de forma a proteger as gaiolas da chuva e os animais terem acesso ao Sol da manhã (Anexo C).

Durante o período de adaptação, as aves foram submetidas a um manejo pela mesma equipe que realizou o experimento posteriormente e tornaram-se familiarizadas com a retirada das bandejas das gaiolas, simulando a coleta das

amostras das excretas, e com a limpeza das mesmas, reposição do alimento e água e restrição do voo.

O experimento ocorreu nos dias 4 e 5 de agosto de 2010, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, município de Botucatu (latitude 22°53’ Sul; longitude 48°26’ Oeste; altitude 804m), São Paulo, cuja Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) aprovou os procedimentos experimentais (Protocolo nº145/2010).

2 Experimento. Dosagem urofecal de metabólitos de glicocorticoides para estabelecer seu perfil diário em Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*).

2.1 Delineamento experimental

Com os 22 animais em gaiolas individuais e adaptados ao manejo e à equipe, as amostras urofecais de cada animal foram colhidas em microtubos plásticos (identificados para cada amostra individual) a cada três horas, por 24 horas, sendo a primeira as 8 horas da manhã do dia 4 e a última as 8 horas da manhã do dia 5 de agosto, totalizando nove colheitas. Imediatamente após a colheita, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o procedimento de liofilização.

Durante todas as colheitas, foi observado o comportamento e a atividade dos animais.

2.2 Processamento das amostras

2.2.1 Liofilização

As amostras foram liofilizadas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP Campus Botucatu. Vinte e quatro horas antes do procedimento, os tubos foram abertos e recobertos com papel alumínio perfurado para evitar a aspiração de seu conteúdo durante o processo, e armazenadas a temperatura de -70°C. Dispostos em racks de papelão, foram levados a liofilizadora (Edward do Brasil) à -45°C e pressão de 60 mbar por 12 horas. Após esse processo, as amostras foram tampadas e armazenadas em freezer a -20°C até o procedimento de extração dos metabólitos hormonais.

2.2.2 Extração hormonal

A extração dos metabólitos hormonais das amostras urofecais foi realizada no Laboratório de Proteínas de Fase Aguda e Monitoramento Não-Invasivo da Reprodução e do Bem-Estar Animal – Campus Botucatu, conforme a metodologia descrita por Möstl et al. (2005) modificada.

As amostras liofilizadas foram homogeneizadas manualmente e pesadas em alíquotas de $0,05 \pm 0,002$ g em tubos de poliestireno. Foi adicionado um mL de metanol 80% a cada amostra e estas foram submetidas a agitação em vortex multitubos por 30 minutos em velocidade alta.

Em seguida, os tubos foram centrifugados a $500 \times g$ 20 minutos. De cada amostra foi pipetado 500 μ L do sobrenadante em microtubos individuais com tampa e identificação. Esses microtubos foram levados a estufa a 50°C por 14 horas para que o metanol evaporasse. A seguir as amostras foram acondicionadas em caixas de papelão fechadas e armazenadas por 15 a 30 dias a temperatura ambiente e depois em freezer comercial (-20°C) até o momento da dosagem hormonal.

2.2.3 Dosagem hormonal

Os metabólitos de glicocorticóides urofecais foram quantificados por Enzimaimunoensaio empregando-se o ensaio Cortisone grupo específico desenvolvida pelo Departamento de Ciências Biomédicas/Bioquímica da Universidade de Medicina Veterinária de Viena, Áustria, seguindo a técnica descrita Fujihara (2012)

Um dia antes do ensaio, as amostras (extratos secos) foram ressuspendidas em 0,4 mL de metanol 100%. Após essa diluição, as alíquotas foram mantidas a -20°C durante 24 horas e posteriormente agitadas por um minuto em multivortex e centrifugado a $8000 \times g$ durante dois minutos.

Para a dosagem, foram preparadas placas de poliestireno contendo 96 poços (F96 MaxiSorp, nº442404) com 50 μ L de proteína de ligação (Proteína A, SIGMA P-7837) e incubadas em temperatura ambiente por 12 horas. Após esse período, descartou-se a solução e acrescentou-se 0,5 mL de uma

segunda solução de ligação (Trishydroxaminomethane+NaCl+BSA+NaN₃). As placas foram tampadas e mantidas em temperatura ambiente por pelo menos três horas.

Passadas as três horas, a segunda solução de ligação foi descartada e as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem Tween 20 (Merck 822184).

Em cada placa, foi pipetado, em duplicada, 30 µL da curva padrão com leituras de 2,05 a 500 pg/célula (S1 = 2,05; S2 = 5,12; S3 = 12,8; S4 = 32; S5 = 80; S6 = 200; S7 = 500 pg/célula), 30 µL das amostras que foram diluídas em diluentes de ensaio na proporção 1:10 e 30 µL dos controles (Figura 1).

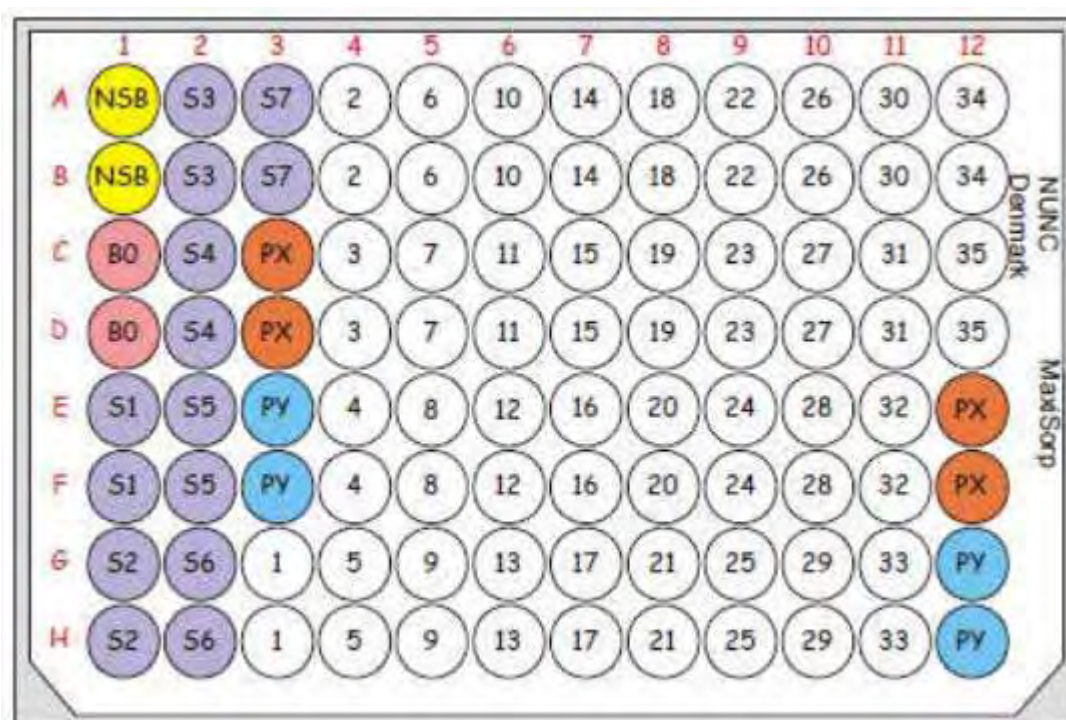


Figura 1 - Ordem de pipetagem das soluções em placa de poliestireno contendo 96 poços, para realização de EIA. NSB – Ligação não-específica, apenas a solução de ensaio; BO – Padrão valor zero. S1 a S7 – Curva padrão, padrões para cada ensaio; Px – Controle de baixa concentração; Py – Controle de alta concentração; 1 a 35 – Amostras. (Fonte: Möstl e Palme, 2008)

Posteriormente, todos os poços, exceto os NSB, recebeu 0,1 mL do antígeno marcado. Em seguida, cada poço recebeu 0,1 mL do anticorpo. As placas foram submetidas a agitação suave por 12 horas à 4°C. Após esse

período, as placas foram lavadas com a solução de lavagem gelada quatro vezes. Adicionou-se solução com Estreptavidina POD-Conjugado (Boehringer 1089153) e incubadas em agitador de placa por 45 minutos a 4°C. Novamente as placas foram lavadas quatro vezes com a solução de lavagem gelada.

Adicionou-se às placas, solução de substrato para peroxidase (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine a 0,4% + H₂O₂ a 0,6%), foram incubadas à 4°C por 45 minutos em agitação e, por fim, adicionou-se 0,5 mL de solução de interrupção da reação enzimática (H₂SO₄ a 95-97%).

Utilizou-se espectrofotômetro MultiPROBE® (Packard) para realizar a leitura de absorbância, empregando-se de 360 a 540 nm de comprimento de onda para a leitura das amostras.

Foram realizados 7 ensaios e foram obtidos os seguintes coeficientes de variação para as amostras: Intraensaio média de 5,3% e interensaio média de 7,7%. A sensibilidade do ensaio utilizando foi de 0,02 pg/célula.

Os resultados foram transformados de picograma para nanograma pela fórmula:

$$\text{ng} = \frac{\text{pg} \times \text{volume do extrato} \times \text{fator de diluição}}{\text{g} \times \text{peso das excretas} \times \text{volume da amostra} \times 1000}$$

3 Análise estatística

Os dados foram analisados usando-se o software SAS versão 2009. Como os dados não apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, eles sofreram transformação logarítmica, após a reposição dos valores perdidos por interpolação linear. Os dados transformados foram analisados empregando-se Modelo de Linear Geral para medidas repetidas (Repeated Measures General Linear Model - rmGLM – PROC MIXED, SAS Institute) para estudar o efeito de sexo e o intervalo da colheita.

Para a representação dos dados nos gráficos e tabela, devido a valores discrepantes, foram utilizados os valores absolutos e empregados as medianas e os quartis e os níveis de significância para todos os testes foi fixados em $p < 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

A despeito da grande variação individual (31 a 1905 ng/g de excretas), a análise das concentrações de GCs nas excretas de papagaio-verdadeiro colhidas a cada três horas durante 24 horas não evidenciou efeito de sexo ($p>0,05$) portanto, os dados de todos os animais foram agrupados e analisados conjuntamente, para estudar o efeito do intervalo de colheita das fezes ao longo do dia (Figura 03).

Houve um efeito significativo entre os intervalos ($p<0,001$), tendo sido observadas as concentrações mais elevadas de metabólitos de GCs nas amostras fecais colhidas entre cinco e oito horas e entre 8 e 11 horas da manhã. As concentrações mais baixas foram observadas entre 17 e 20 horas, 20 e 23 horas e 23 e 2 horas da manhã (Tabela 01).

TABELA 01 - Medianas (p25-p75) das dosagens dos metabólitos de glicocorticoides (ng/g) nas excretas de 12 machos, 10 fêmeas e dos 22 indivíduos totais de papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*), colhidas a cada três horas por 24 horas.

Intervalo	Machos	Fêmeas	Ambos os Sexos
5 às 8h	247,0 (172,6-334,3)	215,3 (117,2-355,0)	223,9 (156,2-349,9) ^a
8 às 11h	258,1 (154,6-360,1)	126,1 (95,3-247,3)	188,7 (104,4-222,8) ^a
11 às 14h	183,7 (112,6-266,3)	114,3 (72,0-193,2)	140,3 (106,5-236,1) ^{ba}
14 às 17h	152,5 (133,5-194,7)	108,5 (73,9-168,1)	144,2 (106,6-183,8) ^{ba}
17 às 20h	148,6 (107,3-176,1)	72,5 (60,3-113,7)	118,7 (71,1-169,1) ^b
20 às 23h	142,8 (122,8-169,0)	127,6 (87,8-164,7)	135,5 (100,1-171,1) ^b
23 às 2h	155,2 (115,0-180,4)	132,1 (97,7-161,7)	138,8 (103,1-167,6) ^b
2 às 5h	151,8 (115,0-174,0)	163,4 (92,1-219,1)	151,8 (110,1-209,5) ^{ba}
5 às 8h	171,1 (133,3-269,8)	170,7 (145,7-389,0)	170,7 (135,4-282,6) ^a

Letras diferentes representam diferença entre os intervalos ($p<0,05$).

Os resultados para o padrão de excreção dos metabólitos de glicocorticóides ao longo do dia em papagaios-verdadeiros machos, fêmeas e em animais de ambos os sexos estão também representados, respectivamente, nas Figuras 2, 3 e 4.

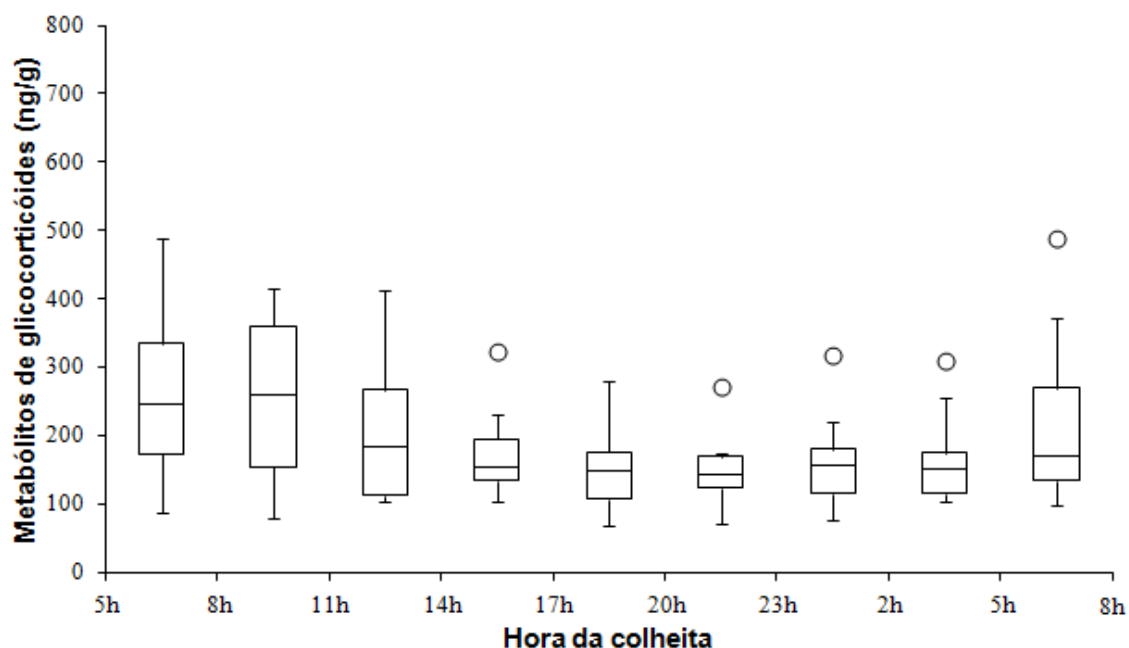


Figura 2 – Boxplot da variação diária de metabólitos de glicocorticoides (ng/g de excretas) de machos de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*). As respectivas medianas aparecem como linhas nas caixas. Círculos brancos correspondem a valores atípicos.

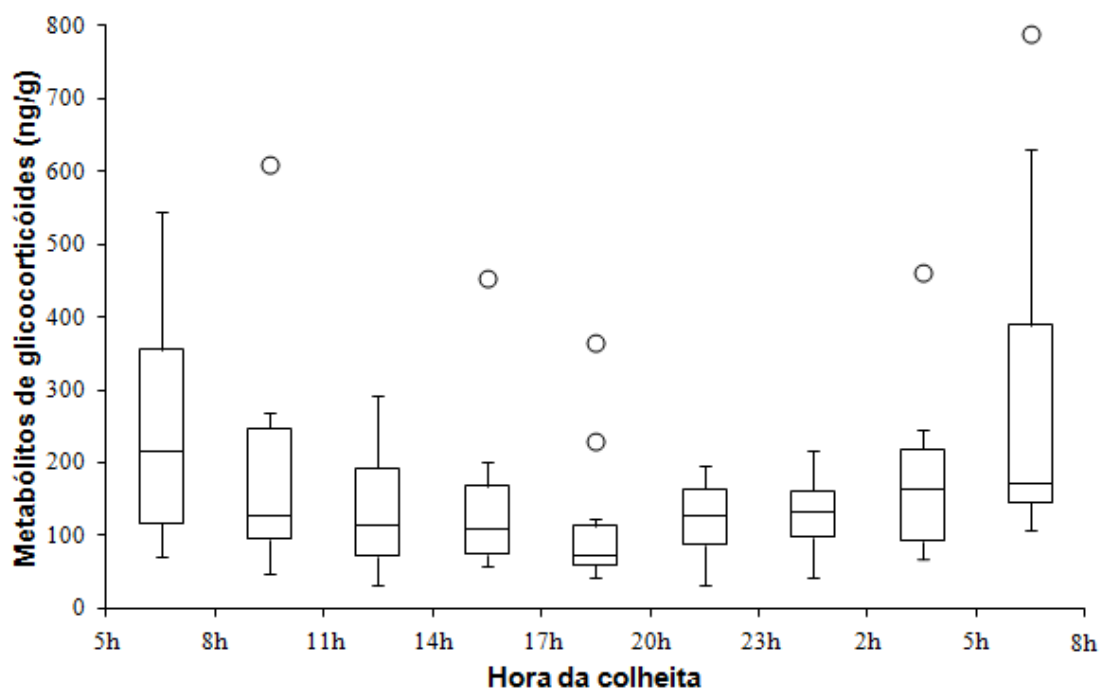


Figura 3 – Boxplot da variação diária de metabólitos de glicocorticoides (ng/g de excretas) de fêmeas de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*). As respectivas medianas aparecem como linhas nas caixas. Círculos brancos correspondem a valores atípicos.

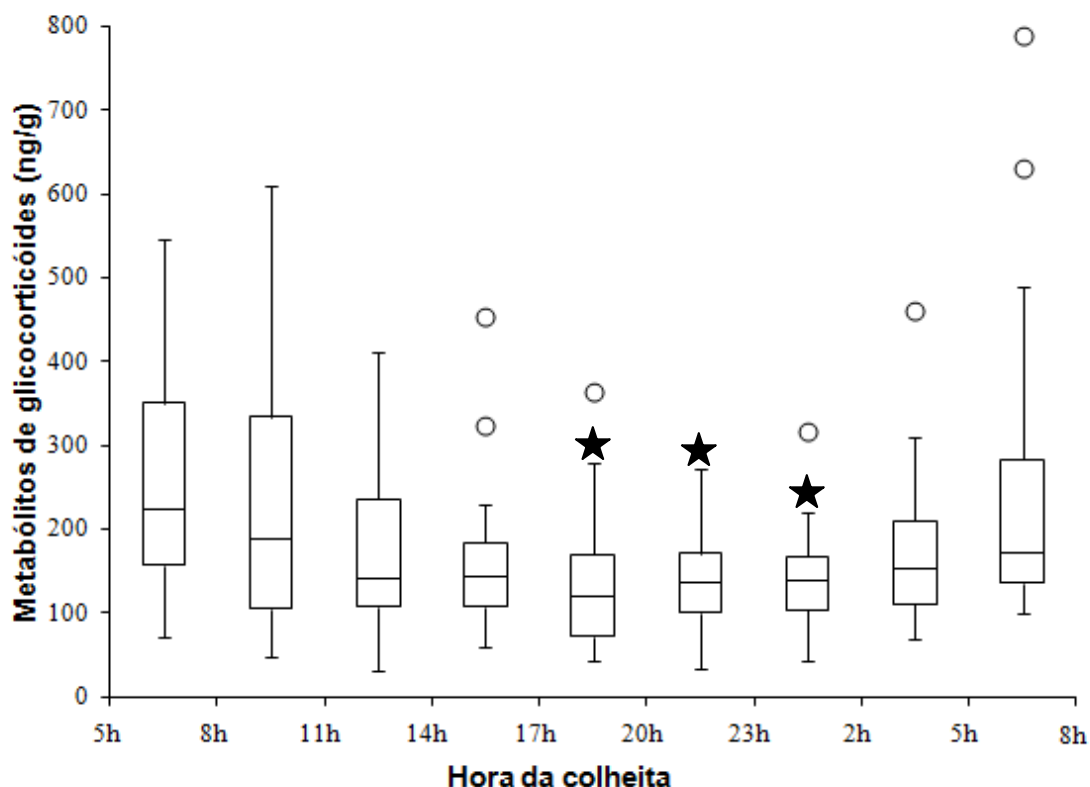


Figura 4 – Boxplot da variação diária de metabólitos de glicocorticoides (ng/g de excretas) de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*). As respectivas medianas aparecem como linhas nas caixas. Círculos brancos correspondem a valores atípicos. Estrelas acima das barras de variação, significa diferenças significativas em relação ao intervalo de 5 a 8 horas da manhã ($p < 0,05$).

Durante todas as colheitas, foi observado a atividade física e o comportamento dos animais. Na primeira colheita, às 8 horas da manhã, os animais apresentaram grande atividade física, explorando todo o espaço que tinham acesso, vocalização apresentando também penas eriçadas e euforia durante a alimentação e a limpeza das gaiolas.

Às 11 horas e às 14 horas foi observado mudança no padrão de comportamento com os animais apresentando pouca atividade física. Nessas ocasiões o tempo era gasto para realização do auto-*grooming*, sendo também observadas a sonolência e a quietude.

Já às 17 horas, foi novamente observada a vocalização intensa e o aumento da atividade física, caracterizada pela exploração contínua de todo o espaço da gaiola. A maioria dos animais se alimentaram novamente nesse horário.

Às 20 horas a maioria dos animais estavam calmos, recolhidos ao seu local habitual de descanso na gaiola, sem vocalização e sonolentos, com *auto-grooming* em alguns casos e um dos membros inferiores recolhidos (Anexo D).

Nos horários das 23 horas, 2 e 5 horas da manhã os animais estavam em seu local de descanso, encolhidos, dormindo e em alguns casos com a cabeça rotacionada 180°, locada no dorso da ave, ou um dos membros inferiores recolhidos, equilibrando-se no outro. Nesse momento, mesmo que acordassem com a presença da equipe, continuavam quietos e inativos, encolhidos e sonolentos.

Na última colheita, às 8 horas da manhã seguinte, os animais novamente apresentaram grande atividade física, vocalização, euforia e penas eriçadas até que fosse reposta a alimentação nas gaiolas. A atividade física e a euforia foi-se reduzindo gradualmente assim que eles se alimentavam.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Neste estudo foi demonstrado com sucesso a variação diária na excreção urofecal de metabólitos de GCs em papagaios-verdadeiros. Também demonstrou que a atividade adrenocortical desta espécie é bem refletida nos metabólitos de GCs das excretas, mensurados por meio da técnica de Enzimaimunoensaio empregando-se o anticorpo Cortisona, validado nesta espécie por Fujihara (2012). Este ensaio foi designado para reconhecer metabólitos de GCs com estrutura molecular 3,11-dioxo.

Apesar da grande variação individual relacionada a concentrações de metabólitos de GCs observada nas excretas de papagaios-verdadeiros, os resultados obtidos demonstraram a existência de um ritmo diário característico de excreção de GCs, sugerindo a existência de um ritmo circadiano de secreção plasmática de corticosterona nessa espécie. Os resultados reforçam os obtidos por Fujihara (2012) e consolidam a existência de um padrão de variação de excreção diária de GCs em papagaios-verdadeiros. Nenhuma variação ultradiana foi detectada.

No presente estudo, não houve diferença entre sexos no padrão diário de excreção de metabólitos de GCs. Esse fato pode estar relacionado a época do ano em que o experimento foi realizado – no inverno, quando os animais estavam fora da estação reprodutiva – como observado em corujas (WASSER et al., 1997; WASSER e HUNT, 2005) e pardais (ASTHEIMER et al., 1994) diferença do padrão diário de excreção de GCs entre machos e fêmeas. Nesses estudos, o padrão foi relacionado a fase reprodutiva, pois fora dessa época, não houve diferença do padrão entre os sexos.

A semelhança das observações feitas, Fujihara (2012) também não observou diferenças relacionadas ao sexo na excreção de metabólitos de CGs em *A. aestiva* em estudo realizado durante a primavera, estação do ano que favorece a reprodução das aves. Analisados em conjunto esses achados sugerem que o padrão semelhante de excreção entre machos e fêmeas pode ser uma característica da espécie *A. aestiva*. Outra possibilidade, que pode ter influenciado os resultados obtidos por Fujihara (2012) é que a ausência das mudanças endócrinas mesmo na primavera pode estar relacionada ao não

desencadeamento da atividade reprodutiva, devido os animais terem sido alojados em gaiolas individuais, sem possibilidade de pareamento.

Os valores máximos de metabólitos de GCs foram detectados nas amostras colhidas entre 5 e 8 horas da manhã e entre 8 e 11 horas da manhã, ou seja, nas primeiras horas do dia. Após o pico, houve um rápido declínio e as concentrações atingiram seus menores valores entre 17 e 2 horas. Este padrão de excreção urofecal de metabólitos de GCs foi também observado em *Parus major* (CARERE et al, 2003), cisne (HIRSCHENHAUSER et al., 2005), ganso (SCHUTZ et al., 1997; CARERE et al., 2003) mas não foi encontrado em Galliformes (frangos, RETTENBACHER et al., 2004; *Tetrao urogallus*, THIEL et al., 2005; *Tetrao tetrix*, BALTIC et al., 2005).

O padrão de excreção urofecal dos metabólitos de GCs é consequente das variações plasmáticas dos GCs, que seguem um ritmo que se modifica de acordo com a variação do fotoperíodo. Essas variações ao longo do dia estão bem documentadas em codornas japonesas, pombos, patos, galinhas, perus (CARSIA e HARVEY, 2000), pardais (*Zonotrichia albicollis*, DUSSEAU e MEIER, 1971; *Z. leucophrys gambelii*, BREUNER et al., 1999), estorninho-comum (*Sturnus vulgaris*, ROMERO e REMAGE-HEALEY, 2000) e pombos (*Columba livia domestica*, WESTERHOT et al., 1994).

Fujihara (2012) injetou ACTH em papagaios-verdadeiros e observou aumento das concentrações de metabólitos de GCs nas excretas nas primeiras três horas após a injeção e um pico entre três e seis horas pós-desafio.

O tempo necessário para as alterações plasmáticas modificarem as concentrações urofecais dos metabólitos de GCs depende da velocidade do transito intestinal (CARERE et al., 2003). Em papagaios-verdadeiros o tempo de transito intestinal é de cerca de 2,1 – 5,5 horas (MCMILAN, 1994) e os indivíduos podem defecar uma a duas vezes a cada três horas¹.

Lothrop et al. (1985) e Zenoble et al. (1985) injetaram ACTH em psitacídeos e dosaram cortisol e corticosterona plasmático. Lothrop et al. (1985) observaram que uma hora após a administração de ACTH as concentrações de corticosterona passaram de 3,25 para 26,47 ng/ml, mantendo-se elevadas (25,69 ng/mL) por até duas horas. Zenoble et al. (1985)

¹ Comunicação pessoal de Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira em setembro de 2012.

também documentaram elevação da corticosterona plasmática após administração de ACTH; as concentrações se elevaram de 20,09 ng/mL para 105,8 ng/mL, 90 minutos após o desafio. Nos dois estudos o cortisol manteve-se praticamente inalterado ou indetectável. Walsh et al. (1985) em estudo semelhante realizado com Cacatuas também observaram aumento da corticosterona plasmática de 26 ng/mL para 108 ng/mL, 30 minutos após a injeção de ACTH. Os valores se mantiveram altos por três horas e decresceram para 40 ng/mL ao final de quatro horas.

Considerando esses estudos em conjunto com os achados de Fujihara (2012) é possível se inferir um atraso de aproximadamente quatro a cinco horas entre o pico plasmático de corticosterona e o pico de excreção de seus metabólitos em papagaios-verdadeiros.

Levando-se em conta esse atraso, é possível deduzir que os níveis plasmáticos de corticosterona em papagaio-verdadeiro se elevam nas últimas horas de escuridão, enquanto os animais ainda estão dormindo, por volta das 5 horas da manhã. Nas condições experimentais deste estudo, o nascer do Sol acontecia às 6 horas e 49 minutos². Esses achados sinalizam que existe uma relação entre os fenômenos endócrinos e as condições ambientais (fotoperíodo) que desencadeiam esse aumento hormonal.

O aumento do glicocorticóides sanguíneos representa o preparo do animal para o início das atividades diárias, que demandaram uma grande disponibilidade de energia (CARSIA e HARVEY, 2000). A fase de vigília dos papagaios começa com o nascer e termina com o pôr do Sol. Como os animais se abrigam em lugares diferentes de onde se alimentam, ao amanhecer, vocalizam intensamente antes e durante as atividades de voo para os locais de forrageamento, onde passam o dia. A demanda energética necessária para o voo matinal, justifica o aumento de corticosterona antes do amanhecer (ROMERO, 2002; BERGMAN e REINISCH, 2006).

A despeito dos animais estarem alojados individualmente e com alimentação *ad libitum* e portanto, sem a necessidade de desempenhar esse comportamento, o pico de corticosterona plasmática antes do amanhecer se manteve, sinalizando que essa preparação endócrina diária foi altamente

² Disponível em: <<http://www.tempoagora.com.br/previsaodotempo.html/brasil/Botucatu-SP/>>
Acesso em: 04 agosto 2010.

preservada ao longo da evolução desta espécie e que mesmo as condições de cativeiro individual, não a altera.

Mesmo impossibilitados de voar os animais demonstraram o reflexo dessa preparação endócrina na forma de grande agitação, vocalização e exploração ativa da gaiola.

Após a alimentação matinal os papagaios gastam grande parte do tempo arrumando suas próprias penas (*auto-grooming*) e do companheiro (*grooming* social) (BERGMAN e REINISCH, 2006). No momento das colheitas das 11 e 14 horas foram observados comportamentos semelhantes, exceto o *grooming* social, que estava inibido devido ao alojamento individual. Estes resultados são compatíveis com os baixos níveis urofecaais de metabólitos de GCs observado nas amostras colhidas das 14 às 17 horas e das 17 às 20 horas, que sinalizam que no período em que acontecem o comportamento de *grooming* e tranquilidade, as concentrações plasmáticas de corticosterona estão nos seus níveis basais.

Ao entardecer, os papagaios realizam o caminho reverso (do local de forrageamento para o local de abrigo) e vocalizam como um cumprimento ou uma chamada a cada membro para que retorne ao grupo (FERNÁNDEZ-JURICIC et al., 1998; BERGMAN e REINISCH, 2006). O desaparecimento do comportamento de *grooming* foi observado na colheita das 17 horas em que os animais apresentavam vocalização exacerbada, penas eriçadas e atividade física aumentada, contudo a despeito da grande agitação, os níveis de metabólitos de corticosterona observados nas amostras obtidas das 20 às 23 horas, cinco horas após a observação desse comportamento, ainda encontravam-se em níveis baixos. Devido a essa agitação no final da tarde, era esperado um outro pico ou um aumento de metabólitos de glicocorticóides porém a ausência da alteração hormonal significa que esse comportamento independe de hormônio.

O por do Sol nas nossas condições experimentais ocorreu as 17 horas e 50 minutos². Durante as colheitas das amostras das 20, 23, 2 e 5 horas da manhã, os animais apresentaram sonolência com postura encorujada, sem atividade ou exploração da gaiola. Nos horários da madrugada (2 e 5 horas), apresentaram recolhimento de um dos membros inferiores, se equilibrando no outro e em alguns casos, rotação do pescoço com a cabeça no dorso. Os

animais que acordaram com a presença da equipe se mantiveram quietos e inativos, sem alterar sua postura. As excretas colhidas nesses intervalos apresentaram níveis baixos de metabólitos de glicocorticóides, refletindo a ausência de um fator desencadeador da elevação plasmática dos glicocorticóides nos horários das 14, 17, 20 e 23 horas.

Durante a última colheita, às 8 horas da manhã, a semelhança do observado na primeira colheita do estudo, foi verificada excitação dos animais, exploração ativa da gaiola e vocalização até se alimentarem. Após a alimentação, essa agitação foi diminuindo gradualmente. Os resultados referente a essas amostras mostraram um aumento dos níveis de metabólitos uofecais de GCs, sinalizando que o aumento plasmático de corticosterona aconteceu entre 2 e 5 horas da manhã, colheitas em que todos os animais estavam dormindo.

O repertório comportamental e variações de excreção de glicocorticóides observados nas aves experimentais durante o estudo sugerem que os animais estavam bem adaptados às condições de cativeiro, pois, guardadas as devidas proporções, os comportamentos observados foram os mesmos que os observados em animais vida livre. Um sinal evidente dessa adaptação, foi a presença do *auto-grooming*, comportamento realizado pelas aves apenas quando estão seguras e calmas (BERGMAN e REINISCH, 2006).

A elevada preservação do comportamento e do padrão circadiano de secreção plasmática de glicocorticóides em papagaios-verdadeiros com longas histórias de vida em cativeiro, como os empregados neste estudo, sugere também que, com o devido cuidado, podem ser desenvolvidas estratégias de reintrodução desses animais ao ambiente natural.

Através da avaliação da atividade adrenocortical é possível melhorar o bem-estar, reprodução e manutenção dessas aves, tanto em vida livre quanto em cativeiro, já que a espécie *A. aestiva* é tão visada pelo tráfico e está sujeita a extinção. Esses achados sinalizam a possibilidade de novas linhas de estudo na espécie.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

As análises hormonais através de técnica não invasiva é uma ferramenta eficaz para estudos da biologia da conservação, bem como para estudos comportamentais e fisiológicos em espécies de aves, tanto em cativeiro quanto em vida livre pela facilidade da coleta sem causar prejuízos ao indivíduo em estudo.

Existe um ritmo diário característico de excreção de GCs.

O padrão diário de excreção de metabólitos de GCs descrito, possui íntima relação com a atividade diária observada em papagaios-verdadeiros.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, J.; SPEER, B.L.; THOMSEN, J.B.T. **The large macaws**. Fort Bragg, CA, Raintree Publications, 1995, 534p.
- ALLGAYER, M.C.; CZIULIK, M. Reprodução de psitacídeos em cativeiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31, p.344-350, 2007.
- ASTHEIMER, L.B.; BUTTEMER, W.A.; WINGFIELD, J.C. Gender and seasonal differences in the adrenocortical response to ACTH challenge in Arctic passerine, *Zonotrichia leucophrys gambelii*. **General and Comparative Endocrinology**. v.94, p.33-43, 1994.
- BALTIC, M.; JENNI-EIERMANN, S.; ARLETTAZ, R.; PALME, R. A noninvasive technique to evaluate human-generated stress in the black grouse. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1046, p.81-95, 2005.
- BAMBERG, E.; PALME, R.; MEINGASSNER, J.G. Excretion of corticosteroid metabolites in urine and faeces of rats. **Laboratory Animals**, v.35, p.307-314, 2001.
- BEERDA, B.; SCHILDER, M.B.H.; JANSSEN, N.S.C.R.M.; MOL, J.A. The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. **Hormones and Behavior**. v.30, n.3, p.272-279, 1996.
- BERGMAN, L.; REINISCH, U.S. Comfort Behavior and Sleep. In: LUESCHER, A.U. (ed): **Manuel of Parrot Behavior**. Ames, Iowa, Blackwell Publishing, 2006, p.59-62.
- BERGMAN, L.; REINISCH, U.S. Parrot Vocalization. In: LUESCHER, A.U. (ed): **Manuel of Parrot Behavior**. Ames, Iowa, Blackwell Publishing, 2006, p.219-224.
- BOONSTRA, R. Coping with changing northern environments: the role of the stress axis in birds and mammals. **Integrative and Comparative Biology**. v.44, p.95–108, 2004.
- BREUNER, C.W.; WINGFIELD, J.C.; ROMERO, L.M. Diel rhythms of basal and stress-induced corticosterone in a wild, seasonal vertebrate, gambel's white-crowned sparrow. **Journal of Experimental Zoology**. v.284, p.334-342, 1999.
- CARERE, C.; GROOTHUIS, T.G.G.; MÖSTL, E.; DAAN, S.; KOOLHAAS, J.M. Fecal corticosteroids in a territorial bird selected for different personalities: daily rhythm and the response to social stress. **Hormones and Behavior**. v.43, p.540-548, 2003.

CARSIA, R.V; HARVEY, S. Adrenals, In: WHITTOW, G.C. (ed): **Sturkie's Avian Physiology**, (ed. 5). San Diego, CA, Academic Press, 2000, p.489-537.

COOK, C.J. Rapid noninvasive measurement of hormones in transdermal exudate and saliva. **Physiology and Behavior**. v.75, p.169-181, 2002.

COLLAR, N.J.; JUNIPER, A.T. Dimensions and causes of the parrot conservation crisis. In. Beissinger, S.R.; Snyder, N.F.R. (ed). **New World Parrot in Crisis: Solutions from Conservation Biology**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1992. p. 1-24.

DALLMAN, M.F.; STRACK, A.M.; AKANA, S.F.; BRADBURY, M.J.; HANSON, E.S.; SCRIBNER, K.A.; SMITH, M. Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. **Frontiers in Neuroendocrinology**. v.14, n.4, p.303-347, 1993.

DARRIEU, C.A. Revision de las razas geográficas de *Amazona aestiva* (Linne), (Aves, Psittacidae). **Neotropica**, v.29, n.81, p.3-10, 1983.

DUSSEAU, J.W.; MEIER, A.H. Diurnal and seasonal variations of plasma adrenal steroid hormone in the white-throated sparrow, *Zonotrichia albicollis*. **General and Comparative Endocrinology**. v.16, p.399-408, 1971.

FERNANDES, R.M.F. **O Sono Normal**, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2006. In: Simpósio: Distúrbios Respiratórios do Sono. v.39, p.157-168, 2006.

FERNÁNDEZ-JURICIC, E.; MARTELLA, M.B.; ALVAREZ, E.V. Vocalizations of the blue-fronted amazon (*Amazona aestiva*) in the Chancaní Reserve, Córdoba, Argentina. **Wilson Bull.**, v. 110, p. 352-361, 1998.

FILE, S.E.; JR ZANGROSSI, H.; SANDERS, F.L.; MABBUTT, P.S. Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor. **Physiology & Behavior**. v.54, p.1109-1111, 1993.

FORSHOW, J.M. **The Parrots of the World**. Willoughby: Lansdownem Press. 1989. p. 584.

FUJIHARA, C. J. **Validação fisiológica da dosagem dos metabólitos de glucocorticóides em fezes de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)**. Botucatu, 2012. 106p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2012.

FUSANI, L.; GWINNER, E. Melatonin and nocturnal migration. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1046, p.264-270, 2005.

GODOY, S.N. Psittaciformes (arara, papagaio e periquito). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. (Eds). **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p.222-251.

GWINNER, E.; SCHWABL-BENZINGER, I.; SCHWABL, H.; DITTAMI, J. Twenty-four-hour melatonin profiles in a nocturnally migrating bird during and between migratory seasons. **General and Comparative Endocrinology**. v.90, p.119-124, 1993.

HASTINGS, M.H.; HERZOG, E.D. Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. **Journal of Biological Rhythms**. v.19, n.5, p.400-13, 2004.

HIRSCHENHAUSER, K.; KOTRSCHAL, K.; MÖSTL, E. Synthesis of measuring steroid metabolites in goose feces. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1046, p.138-153, 2005.

HOROWITZ, T.S.; CADE, B.E.; WOLFE, J.M.; CZEISLER, C.A. Efficacy of bright light and sleep/darkness scheduling in alleviating circadian maladaptation to night work. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**. v.281, p.E384-E391, 2001.

ICMBio/MMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/Ministério do Meio Ambiente. **Lista animais ameaçados de extinção**. Brasília, 2011. Disponível em <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 30 jul. 2012.

IUCN – International Union for Conservation of Nature. **Red list of threatened species. Versão 2011.2**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 30 jul. 2012.

JENNI-EIERMANN, S.; HASSELQUIST, D.; LINDSTRÖMB, Å.; KOOLHAAS, A.; PIERSMA, T. Are birds stressed during long-term flights? A wind-tunnel study on circulating corticosterone in the red knot. **General and Comparative Endocrinology**. v.164, p.101-106, 2009.

KORTE, S.M.; KOOLHAAS, J. M.; WINGFIELD, J.C.; MCEWEND, B.C. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**. v.29, p.3–38, 2005.

KOTRSCHAL, K.; DITTAMI, J.; HIRSCHENHAUSER, K.; MÖSTL, E.; PECZELY, P. Effects of physiological and social challenges in different seasons on fecal testosterone and corticosterone in male domestic geese (*Anser domesticus*). **Acta Ethologica**. v.2, p.115–122, 2000.

LEITE, K. C. E. **Análise da Estrutura Genética e Biologia reprodutiva do Papagaio- Verdadeiro (*Amazona aestiva*)**. 2007. 63 f. Dissertação Mestrado, Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília - DF, 2007.

LIVET, J. **Histoire des zoos en Europe.** Disponível em: <http://www.leszoosdanslemonde.com/introduction/zoos_histoire.htm>. Acesso em: 9 de setembro de 2012.

LOTHROPS, C.D.; OLSEN, J.H.; LOOMIS, M.; JENSEN, J.M.; LENHARD, A. Evaluation of adrenal function in psittacine birds, using the ACTH stimulation test. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v.187, p.1113-1115, 1985.

LUNDBERG, U. Stress hormones in health and illness: The roles of work and gender. **Psychoneuroendocrinology**, v.30, p.1017–21, 2005.

MALISCH, J.L.; BREUNER, C.W.; GOMES, F.R.; CHAMPPELL, M.A.; JR GARLAND, T. Circadian pattern of total and free corticosterone concentrations, corticosteroid-binding globulin, and physical activity in mice selectively bred for high voluntary wheel-running behavior. **General and Comparative Endocrinology.** v.156, p.210-217, 2008.

MARTINEZ, D.; LENZ, M.C.S.; MENNA-BARRETO, L. Diagnóstico dos transtornos do sono relacionados ao ritmo circadiano. **Jornal Brasileiro Pneumologia.** v.34, n.3, p.173-180, 2008.

MCCARTHY, J.L.; CORLEY, R.C.; ZARROW, M.X. Diurnal rhythm in plasma corticosterone and lack of diurnal rhythm in plasma compound F-like material in the rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.** v.104, p.787-789, 1960.

MCMILLAN, M. Imaging Techniques In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. (ed) **Avian medicine: principles and application.** Wingers, Lake Worth, 1994, p. 246-326.

MIGEON, C.J.; FRENCH, A.B.; SAMUELS, L.T.; BOWERS, J.Z. Plasma 17-hydroxycorticosteroid levels and leucocyte values in the rhesus monkey, including normal variation and the effect of ACTH. **American Journal of Physiology.** v.182, p.462-468, 1955.

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology.** v.23, p.67–74, 2002.

MÖSTL, E.; PALME, R. **Measuring faecal steroid metabolites with enzyme immunoassays (EIA) on microtitre plates using biotinylated steroids as labels.** Viena. 2008. 16p.

MÖSTL, E.; RETTENBACHER, S.; PALME, R. Measurement of corticosterone in birds' droppings: an analytical approach. **Annals of the New York Academy of Sciences.** v.1046, p.17-34, 2005.

MÜLLER, C.; JENNI-EIERMANN, S.; BLONDEL, J.; PERRET, P.; CARO, S.P.; LAMBRECHTS, M.M.; JENNI, L. Circulating corticosterone levels in breeding blue tits *Parus caeruleus* differ between island and mainland populations and

between habitats. **General and Comparative Endocrinology**. v.154, p.128-136, 2007.

O'MALLEY, B. Avian anatomy and physiology. In: _____ **Clinical Anatomy and Physiology of Exotic Species**. 1 ed. Germany: Elsevier Limited, cap. 6, p.129-154, 2005.

PALME, R.; FISCHER, P.; SCHILDORFER, H.; ISMAIL, M.N. Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. **Animal. Reproduction Science**. v.43, p.43–63, 1996.

PALME, R.; ROBIA, C.; MESSMANN, S.; HOFER, J.; MÖSTL, E. Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: a non-invasive parameter of adrenocortical function. **Wien. Tierärztl. Mschr**. v.86, p.237–241, 1999.

RENTAS - Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres. **1º Relatório Nacional sobre o Tráfico de Fauna Silvestre**. 2001. Disponível em: <<http://www.rentas.org.br/pt/home/>>. Acesso em: 30 jul. 2012.

RETTENBACHER, S.; MÖSTL, E.; HACKL, R.; GHAREEB, K.; PALME, R. Measurement of corticosterone metabolites in chicken droppings. **British Poultry Science**. v.45, n.5, p.704-711, 2004.

ROMERO, L.M. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. **General and Comparative Endocrinology**. v.128, p.1–24, 2002.

ROMERO, L.M. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. **Trends in Ecology and Evolution**. v.19, p.249–255, 2004.

ROMERO, L.M.; REED, J.M. Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology**. v.40, p.73-79, 2005.

ROMERO, L.M.; REMAGE-HEALEY, L. Daily and seasonal variation in response to stress in captive starlings (*Sturnus vulgaris*): Corticosterone. **General and Comparative Endocrinology**. v.119, p.52-59, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**. v.21, p.55–89, 2000.

SCHATZ, S.; PALME, R. Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a noninvasive method for evaluating adrenocortical function. **Veterinary Research Communications**. v.25, p.271–287, 2001.

SCHERER-NETO, P.; KLEMMANN JUNIOR, L.; PRESTES, N.P.; MARTINEZ, J.; SIPINSKI, E.; SEIXAS, G.; CAPARROZ, R.; MIYAKI, C.; WAJNTAL, A.; SOMENZARI, M.; SCHUNCK, F.; BODRATI, A.; COCKLE, K.; ABE, L.M.; SOARES, E.S. **Plano de Ação Nacional para a Conservação do Gênero Amazona (Papagaios)**. Brasília - DF: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio - Ministério do Meio Ambiente MMA, 2011.

SCHÜTZ, K.; WALLNER, B.; KOTRSCHAL, K. Diurnal patterns of steroid hormones from feces in greylag goslings (*Anser anser*). **Adv Ethology**. v.32, p.66, 1997.

SELYE, H. The Evolution of the Stress Concept. **American Scientist**. v.61, n.6, p.692-699, 1973.

SICK, H. Ordem Psittaciformes. In: _____ **Ornitologia Brasileira**. 4ª impressão. Rio de Janeiro- RJ: Editora Nova Fronteira, cap. 10, p.351-382, 2001.

THIEL, D.; JENNI-EIERMANN, S.; PALME, R. Measuring corticosterone metabolites in droppings of capercaillies (*Tetrao urogallus*). **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1046, p.96-108, 2005.

TOUMA, C.; PALME, R. Measuring Fecal Glucocorticoid Metabolites in Mammals and Bird The Importance of Validation **Annals of New York Academy of Sciences**. v.1046, p.54–74, 2005.

TOUMA, C.; PALME, R.; SACHSER, N. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. **Hormonal Behavior**. v.45, p10-22, 2004.

WALSH, M.T.; BELDEGREEN, R.A.; CLUBB, S.L.; CHEN, C.L. Effect of exogenous ACTH on serum corticosterone and cortisol concentrations in the Moluccan cockatoo (*Cacatua moluccensis*). **American Journal of Veterinary Research**. v.46, p.1584-8, 1985.

WASSER, S.K.; BEVIS, K.; KING, G.; HANSON, E. Noninvasive physiological measures of disturbance in the northern spotted owl. **Conservation Biology**. v.11, n.4, p.1019-1022, 1997.

WASSER, S.K.; HUNT, K.E. Noninvasive measures of reproductive function and disturbance in the barred owl, great horned owl, and northern spotted owl. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1046, p.109-137, 2005.

WASSER, S.K.; HUNT, K.E.; CLARKE, C.M. Assessing stress and population genetics through noninvasive means. In: AGUIRRE, A.A.; OSTFELD, R.S.; TABOS, G.M.; HOUSE, C.; PEARL, M.C. (Eds.) **Conservation Medicine - Ecological Health in Practice**. New York: Oxford University Press, 2002. p.131-144.

WESTERHOF, I.; MOL, J.A.; VAN DEN BROM, W.E.; LUMEIJ, J.T.; RIJNBEEK, A. Diurnal rhythms of plasma corticosterone concentrations in

racing pigeons (*Columba livia domestica*) exposed to different light regimens, and the influence of frequent blood sampling. **Avian Diseases**. v.38, p.428-434, 1994.

WINGFIELD, J.C. Comparative endocrinology, environment and global change. **General and Comparative Endocrinology**. v.157, p.207-216, 2008.

WINGFIELD, J.C.; SILVERIN, B. Ecophysiological Studies of Hormone–Behavior Relations in Birds. **Physiology and Behavior**. v.24. p.817-854, 2009.

YASUO, S.; WATANABE, M.; OKABAYASHI, N.; EBIHARA, S.; YOSHIMURA, T. Circadian clock genes and photoperiodism: Comprehensive analysis of clock gene expression in the mediobasal hypothalamus, the suprachiasmatic nucleus, and the pineal gland of Japanese quail under various light schedules. **Endocrinology**. v.144, p.3742-3748, 2003.

ZANETTE, L.; SMITH, J.N.M.; OORT, H.V.; CLINCHY, M. Synergistic effects of food and predators on annual reproductive success in song sparrows. **Proceedings of the Royal Society**. v.270, p.799-803, 2003.

ZENOBLE, R.D.; KEMPPAINEN, R.J.; YOUNG, D.W.; CARPENTER, J.W. Effect of ACTH on plasma corticosterone and cortisol in eagles and condors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**., v.187, p.1119-1120, 1985.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A – Identificação no estudo, sexo, peso e identificação de origem dos animais utilizados no experimento. Animais provenientes de apreensão e doados pelo Parque Estadual do Tietê (PET), Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) e Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros" – Sorocaba (número). Todos os animais estavam alocados no CEMPAS – Botucatu desde 2008.

ID Machos	Peso (g)	ID de origem	ID Fêmeas	Peso (g)	ID de origem
A	444	461	O	480	FPZSP 676
B	454	FPZSP C283	P	400	PET 10.5 14304
C	412	PFZSP C245	Q	380	PET 10.5 14308
D	384	FPZSP C248	R	345	FPZSP 130
E	470	PFZSP C321	S	460	Sem anilha
F	448	460	T	366	Anilha sem nº
G	306	YURI 033	U	380	PET 10.5 14281
H	525	463	V	430	PET 10.6 14306
I	432	FPZSP C291	X	392	Sem anilha
J	404	FPZSP C237	Z	435	PET 10.5 14292
K	430	Sem anilha			
L	410	FPZSP C305			

Anexo B – Descrição da composição básica e níveis de garantia da ração extrusada para psitacídeos de grande e médio porte – Papagaio Mix Biotron® - utilizada para alimentar as aves durante o experimento.

Composição básica: Quirera de Arroz, Calcário Calcítico, Fosfato de Bicálcico, Aroma de Frutas, Farelo de Soja, Milho Moído, Óleo Vegetal, Cloreto de Sódio (Sal Comum), Corante, Premix Vitamínico Mineral Aminoácido.

VITAMINAS	MINERAIS
Vitamina A	Cobalto
Vitamina D	Cobre
Vitamina E	Cromo
Vitamina K	Ferro
Vitamina B1	Iodo
Vitamina B12	Manganês
Vitamina B2	Selênio (orgânico)
Vitamina B6	Zinco (Orgânico)
Vitamina C	
Niacina	AMINOÁCIDOS
Ác. Fólico	Lisina
Ác. Pantotênico	Metionina
Biotina	Triptofano
Colina	Triosina

NÍVEIS DE GARANTIA	
Cálcio (máx.)	1,60%
Extrato Etéreo (mín.)	1,20%
Fósforo (mín.)	0,45%
Matéria Fibrosa (máx.)	3,00%
Matéria Mineral (máx.)	4,80%
Proteína Bruta (mín.)	16,00%
Umidade (máx.)	13,00%

Fonte: <http://www.biotronzootecnica.com.br/produtos-interna.aspx?codigo=30>

Anexo C – Foto da disposição das gaiolas. Placas (azuis) posicionadas em cada gaiola a fim de proporcionar sombra aos animais, durante a manhã, pois as gaiolas estavam voltadas para o nascer do Sol.



Anexo D – Foto de um dos indivíduos em postura de descanso. Apoio em apenas um dos membros e postura encorujada.



ARTIGO

Ritmos endócrinos e comportamentais diários em mamíferos e aves selvagens

Trabalho Artigo de Revisão Bibliográfica a ser enviado para a revista Veterinária e Zootecnia, cujas normas estão descritas abaixo:

Os artigos de revisão bibliográfica serão publicados nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante na área específica do assunto abordado, a convite dos editores. Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com keywords e resumen com palabras claves, introdução, desenvolvimento do assunto, conclusão e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

RITMOS ENDÓCRINOS E COMPORTAMENTAIS DIÁRIOS EM MAMÍFEROS E AVES SELVAGENS

RESUMO

O ciclo noite-dia, temperatura, umidade do ar, presença de predadores e disponibilidade de alimentos obriga que os seres vivos a possuir ritmos diários para acompanhar essas mudanças ambientais. Além desses fatores ambientais, o relógio biológico também é regulado por hormônios como a melatonina e os glicocorticoides, estes, influenciados pelo fotoperíodo. Os fatores ambientais e endócrinos ajudam a modelar o comportamento. A secreção de melatonina é estimulada pela ausência de luz, é o principal hormônio responsável pelo sono. Os glicocorticoides são secretados no começo da fase ativa a fim de disponibilizar energia, aumentando a glicemia, para o início das atividades diárias. Fatores sazonais podem alterar o padrão de excreção desses hormônios, a fim de alterar a atividade comportamental. O objetivo dessa revisão foi apresentar os principais componentes endócrinos, que controlam ou participam do controle dos ritmos diários e como estes influenciam o comportamento dos animais.

Palavras-chave: fotoperíodo, melatonina, glicocorticóide

ENDOCRINE RHYTHMS AND BEHAVIORAL DAILY IN WILD BIRDS AND MAMMALS

ABSTRACT

The day-night cycle, temperature, humidity, the presence of predators and food availability requires that living beings possess daily rhythms to accompany these environmental changes. In addition to these environmental factors, the biological clock is also regulated by hormones such as melatonin and glucocorticoids, these are influenced by photoperiod. Endocrine and environmental factors help shape behavior. The secretion of melatonin is stimulated by the absence of light, is the main hormone responsible for sleep. Glucocorticoids are secreted at the beginning of the active phase in order to provide energy, increasing glucose to the start of daily activities. Seasonal factors may alter the pattern of excretion of these hormones in order to change the behavioral activity. The objective of this review was to present the main endocrine components that control or participate in the control of daily rhythms and how they influence the behavior of animals.

Keywords: photoperiod, melatonin, glucocorticoids

RITMOS ENDOCRINAS Y COMPORTAMIENTO DIARIOS EN AVES Y MAMÍFEROS SILVESTRES

RESUMEN

El ciclo día-noche, la temperatura, la humedad, la presencia de depredadores y la disponibilidad de alimentos requiere que los seres vivos poseen ritmos diarios que acompañan a estos cambios ambientales. Además de estos factores ambientales, el reloj biológico también está regulada por hormonas como la melatonina y los glucocorticoides, estos están influenciados por el fotoperíodo. Los factores endocrinos y ambientales ayudan a conformar el comportamiento. La secreción de melatonina es estimulada por la ausencia de luz, es la hormona principal responsable de sueño. Los glucocorticoides se secretan en el comienzo de la fase activa a fin de proporcionar energía, aumento de la glucosa para el inicio de las actividades diarias. Factores

estacionales pueden alterar el patrón de excreción de estas hormonas con el fin de cambiar la actividad de comportamiento. El objetivo de esta revisión es presentar los componentes principales endocrinas que controlan o participan en el control de los ritmos diarios y cómo influyen en el comportamiento de los animales.

Palabras claves: fotoperíodo, melatonina, glucocorticoides

INTRODUÇÃO

Eventos ambientais diários, tais como o ciclo foto periódico noite-dia, variações da temperatura e umidade do ar, presença de predadores e disponibilidade de alimentos obrigam os seres vivos a ativarem uma série de processos fisiológicos, de forma rítmica, que lhes permitam acompanhar essas variações (1).

Contudo, os ritmos biológicos não são orquestrados apenas pelas variações ambientais cíclicas. Essencialmente, existe em cada espécie uma ritmicidade biológica inata geneticamente determinada. Um exemplo desse fenômeno são os ritmos circadianos (do latim: *circa* = em torno de; *dies* = do dia). Só podem ser considerados circadianos os ciclos que se repetem diariamente de forma constante, a despeito das influências externas, em período aproximado, mas não necessariamente de exato, de 24 horas. Contudo, esse ciclo deve também possuir a capacidade de se ajustar perfeitamente às 24 horas quando exposto ao fotoperíodo natura (2,3).

As atividades de caráter circadiano são ajustada pelo relógio biológico. As principais funções desse relógio circadiano é otimizar as manifestações temporais das diferentes atividades biológica ao longo do dia, permitindo assim a antecipação das variações ambientais recorrentes e separar processos biológicos incompatíveis tais como alimentação e o sono (4).

A robustez dos ritmos biológicos permite que estes se mantenham mesmo quando o indivíduo é submetido repentinamente a um ambiente artificial (5) e propiciam ao organismo estar sempre preparado para os eventos ambientais diários rotineiros, sem que seja surpreendido, por exemplo, pelo nascer ou pôr do Sol (6).

Uma série de genes interconectados em um processo transcripcional autorregulado por um sistema de retroalimentação, gera um ciclo circadiano dentro de cada uma das trilhões de células de um organismo animal. Esse ritmo molecular é funcional em virtualmente todos os tecidos periféricos, sendo contudo supervisionado por um regulador central localizado no núcleo hipotalâmico supraquiasmático (7).

Os hormônios esteroides, secretados pelo córtex da adrenal, exercem um papel fundamental no controle da homeostase interna e das respostas orgânicas ao meio externo. Os corticosteroides regulam os níveis de água e eletrólitos corporais e controlam o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios (8,9). Existem três tipos de hormônios corticosteroides sintetizados por células especializadas em diferentes sub-regiões da córtex da adrenal: a camada mais externa, denominada zona glomerulosa (ZG), secreta minerais corticoides; a camada central, chamada zona fascicular (ZF), produz glicocorticoides; e a camada mais interna, ou zona reticulata, produz andrógenos (10).

A síntese de cada um desses hormônios é dinamicamente regulada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA) (11); contudo, de forma não menos importante, a secreção dos glicocorticoides adrenais encontra-se também sob o controle do relógio circadiano central que orquestra muitos aspectos do metabolismo e do comportamento (7).

A íntima coordenação do sistema nervoso central (SNC) sobre o padrão de secreção de glicocorticoides e a importância desses hormônios para o metabolismo corporal, confirmam cada vez mais que a adrenal, não atua como um simples relógio

biológico periférico, mas sim que possui um papel especial na transformação dos sinais temporais neurais oriundos do SNC em sinais temporais humorais, que por via endócrina atuam nos tecidos periféricos e fazem o ajuste dos diversos relógios celulares (12).

Devido a importância dos glicocorticoides para o controle das atividades circadianas esta revisão tem como objetivo apresentar os principais sistemas reguladores da secreção circadiana dos glicocorticoides e o papel desses hormônios na adaptação do organismo ao relógio biológico central e, conseqüentemente, ao meio ambiente.

REVISÃO DE LITERATURA

Relógios biológicos moleculares

O conhecimento acumulado até o momento pelos estudos sobre a ritmicidade temporal celular sugere que o mecanismo central do relógio molecular das células dos mamíferos é composto por uma série de genes relógios que tem sua expressão regulada por um sistema de retroalimentação que intercala transcrição e translação gênica (4).

As principais engrenagens desse relógio celular são os produtos proteicos dos genes *Per* (*Per1*, *Per2*, *Per3*), *Cry* (*Cry1*, *Cry2*), *Clock* e *Bmal1* (7). O E-box de ação regulatória *Cis* promotor dos genes *Cry* e *Per* desempenha um papel central na geração da transcrição circadiana rítmica. Durante o dia subjetivo, os heterodímeros das proteínas CLOCK-BMAL1 ativam a transcrição gênica no E-box, e por sua vez a expressão os genes *Per* e *Cry*. As proteínas formadas a partir dessa ativação, PER 1-3 e CRY 1-2, interagem e formam complexos que vão se acumulando no núcleo das células. Quando o acúmulo intra-nuclear desses complexos alcança uma determinada concentração eles interagem com o complexo CLOCK-BMAL1 e inibem a função desse dímero interrompendo assim a transcrição dos genes *Per* e *Cry* (13). Durante a noite subjetiva, ocorre a progressiva degradação do complexo PER-CRY que acaba sendo insuficiente para interromper função transcricional do complexo CLOCK-BMAL1, fazendo assim com que o ciclo se reinicie (4).

Além desse sistema principal de regulação do relógio celular, outros mecanismos secundários, que também estão sob a influencia das transcrições mediadas pelo E-box, composto por proteínas da família PAR bZip (DBP, TEF, HLF) e seu antagonista transcricional E4BP4, e as proteínas RORs e antagonista REV-ERBs, fornecem robustez e redundância ao sistema (7,14,15).

Uma vez ativados, os genes que controlam o relógio celular influenciam também a expressão de outros genes que controlam as alterações circadianas da fisiologia e comportamento (16,17).

Entretanto, os reguladores intracelulares não estão isolados; sinais extracelulares sincronizam ou acertam o relógio celular, agindo nos receptores dos tipos CRE (responsivo ao Cálcio e AMPc) e GRE (receptor de glicocorticoides), por interferirem na promoção da transcrição dos genes *Per* (18).

A regulação dos incontáveis relógios celulares dentro do organismo é realizada por um relógio central, localizado no núcleo hipotalâmico supraquiasmático, que exerce suas funções de modo nervoso e/ou endócrino (7). Neurônios relógios desses núcleos apresentam oscilações robustas de transcrição e de atividade elétrica, mesmo quando cultivados *ex vivo* por longo período de tempo (19). De modo a harmonizar todo o organismo, o SCN envia sinais aos órgãos periféricos por meio de três rotas: os sistemas nervosos simpático e parassimpático e os glicocorticoides adrenais.

Papel das células adrenais produtoras de glicocorticoides na mediação dos sinais circadianos oriundos do SNC

A percepção de uma robusta secreção circadiana de glicocorticoides (cortisol em humanos e na maioria dos mamíferos (20) e corticosterona em alguns roedores (21) e aves (22)) foi uma descoberta precoce importante na biologia circadiana. Enquanto a regulação da secreção de glicocorticoides relacionada ao estresse pelo eixo hipotalâmico hipofisário adrenal (HHA) tem sido intensamente estudada, o controle circadiano da sua secreção tem permanecido um tanto quanto obscura. Uma vez que a secreção circadiana rítmica de glicocorticoides é abolida após lesões do SNC, fica evidente que o “relógio central” é indispensável para o controle da secreção (21).

Nos animais diurnos, de modo oposto ao que acontece nos noturnos, as concentrações séricas de glicocorticoides são altas no início do dia e baixas no começo da noite (23). O interessante é que o aumento dos glicocorticoides ocorre antes do início da fase ativa (20), o que indica que esse aumento não reflete uma resposta aguda a um estímulo externo e sim que é controlada pelo SNC em antecipação ao início da atividade (7).

A liberação de GCs é feita pela córtex da adrenal após estímulo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). A secreção de GCs ocorre em resposta a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) proveniente da hipófise anterior, que por sua vez, é estimulada pelo CRH e a vasopressina (AVP) derivados de neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo (24,25).

De acordo com o conceito do eixo HHA, os ritmos circadianos seriam induzidos pela secreção circadiana de ACTH pela hipófise. Essa hipótese foi reforçada pelo fato da secreção do ACTH apresenta ritmos diários robustos similares e sempre 30-60 minutos antes da secreção dos glicocorticoides em humanos (20). Contudo, essa percepção vem sendo gradativamente modificada a partir de estudos realizados em ratos e bezerros que demonstraram que apesar do ACTH ser aparentemente necessário para a secreção circadiana de glicocorticoides, o gerador circadiano essencial tem localização extra-hipofisária (26,27,28,29).

A essencialidade ACTH ficou explícita a partir de estudos que demonstraram que em ratos a hipofisectomia abole completamente a ritmicidade circadiana da secreção de glicocorticoides adrenais (26) e que nos animais hipofisectomizados, a implantação de um *pellet* de ACTH restabelecia a ritmicidade da secreção (27). Contudo, nesses mesmos estudos, ficou evidente que esse fenômeno não dependia exclusivamente do ACTH, pois a ritmicidade foi novamente abolida pela transecção da medula espinal no nível da vértebra T7 e que transecções espinais caudais a vértebra L1 não tinha esse mesmo efeito.

Estudos posteriores realizados em bezerro (28,29) confirmaram os achados encontrados em ratos e ajudaram a formular a teoria atual de que o SNC, por meio do sistema nervoso simpático, coordenar o ritmo da secreção circadiana de glicocorticoides adrenais. Contudo, para que essa função seja exercida, é fundamental a existência de concentrações plasmáticas pelo menos basais de ACTH.

A coordenação adrenal, realizada pelo SNC está sob um rígido controle do ciclo luz-escuridão diária. A percepção da luz nos mamíferos é restrita ao olho e o trato retinohipotalâmico converte a estimulação retinal pela luz em informações ao SNC. O SNC atua então, a partir desse ponto, como o único receptor para a luz que é empregado para coordenar o comportamento circadiano (30).

A exposição a luz rapidamente estimula, no trato retinohipotalâmico, a expressão de genes de expressão rápida (immediate early gene – IEG). Uma vez estimulado pela

206 luz o trato retinohipotalâmico tem ativação da transcrição de determinados genes. Esse
207 comportamento de expressão central é seguido por um aumento dramático da expressão
208 do gen *Per1* na glândula adrenal, enquanto que em outros órgãos, tais como fígado e
209 rins, a transcrição permanece inalterada (31).

210 Além do *Per1*, usando a tecnologia *microarrays*, observou-se que mais de 156
211 genes são estimulados e 39 silenciados na adrenal em resposta a exposição à luz. A
212 observação de que essa resposta é abolida quando os nervos adrenais simpáticos são
213 seccionados deixa mais uma vez evidente que esse fenômeno está sob o controle do
214 SNC. Cerca de 60-90 minutos após o aumento da expressão gênica, observa-se o
215 aumento da corticosterona plasmática e cerebral, sem que se observe a ativação
216 concomitante do eixo HHA (4).

217 O conjunto dessas informações tornou evidente que o mecanismo de controle da
218 secreção circadiana dos glicocorticoides é completamente diferente da reação clássica
219 de estresse, na qual os glucocorticoides adrenais estão sobre controle estrito do eixo
220 HHA e aumentam cerca de 2-5 minutos após esse sistema ser ativado por um agente
221 estressor (32).

222 A rota de transmissão das informações neurais, a partir do SNC até a adrenal
223 também vem sendo elucidada nos últimos anos. As informações captadas pela retina,
224 após serem registradas pelo trato retinohipotalâmico, são processadas no SNC e servem
225 para coordenar a secreção de glicocorticoides adrenais. Essa coordenação acontece por
226 rota neural simpática do núcleo intermediolateral (IML) (33).

227 O mecanismo pelo qual as informações neurais simpáticas aumentam a secreção
228 dos esteroides do córtex da adrenal provavelmente envolve a liberação das
229 catecolaminas pela região medular dessa glândula. Essa hipótese é reforçada pelo
230 aumento da adrenalina plasmática que ocorre em minutos após o início da exposição à
231 luz e pelo aumento da transcrição do gen *Per1* em resposta a administração de
232 adrenalina (2mg/Kg) (32).

233 A rota simpática IML que regula a secreção dos glicocorticoides é semelhante ao
234 controle da secreção de melatonina pela pineal. A secreção circadiana de melatonina é
235 conhecida como sendo regulada pelo SNC por uma via pós-sináptica que comunica o
236 IML e o gânglio cervical superior (GCS) com a glândula pineal e regula a expressão da
237 araquilamina N-acetiltransferase, enzima que limita a síntese de melatonina. A luz, via
238 SNC, em poucos minutos diminui a secreção de melatonina pela mesma rota simpática
239 (34,35,36). Visto que a medula adrenal e o gânglio simpático são derivados da mesma
240 crista neural, nesse sistema o GCS seria similar à medula adrenal, e a pineal semelhante
241 à córtex da adrenal (7).

242 A secreção de glicocorticoides, uma vez que é diretamente regulada pelo SNC,
243 tem papel essencial na transmissão dos sinais luminosos aos órgãos internos “cegos”.
244 Contudo, mesmo sob condições constantes, como por exemplo escuridão contínua, a
245 ativação circadiana do eixo SNC-simpático-adrenal ocorre e é também necessária para a
246 geração dessa variação circadiana dos níveis de glicocorticoides, aumentando ao
247 amanhecer do dia fisiológico subjetivo. Assim a glândula adrenal age como um
248 transdutor do relógio biológico do SNC sincronizando o metabolismo do corpo todo
249 (4,7).

250 De modo aparentemente sincrônico com a variação a atividade secretória adrenal,
251 outros hormônios e neurotransmissores também têm sua secreção vinculada ao ciclo
252 dia-noite, facilitando o estado de vigília ou de sono. Neuro-transmissores, como o
253 próprio CRH e o fator de liberação da tireotrofina (TRF), são importantes para a fase de
254 vigília. Nas primeiras horas da manhã, em humanos, há aumento da secreção dos
255 hormônios tireoideanos e de insulina, importantes para o aumento da taxa metabólica

para o início das atividades do dia. Esses hormônios, juntamente com os glicocorticoides são essenciais para diversos processos metabólicos, tais como aumento da glicemia e a utilização de glicose pelas células (36,37). Os GCs também ativam o sistema neuronal, aumentando a pressão sanguínea arterial, o tônus muscular e a frequência respiratória. Essas alterações estimulam o catabolismo celular em detrimento do anabolismo celular (responsável pela reparação, cicatrização e crescimento) que é induzido pelos esteroides sexuais e hormônios do crescimento (24,38).

CONCLUSÃO

Dentro da luz do conhecimento atual sobre a biologia circadiana importantes modificações da função celular são coordenadas, em todo o corpo, por um robusto relógio biológico que antecipa as modificações do dia astronômico deixando-o sempre pronto para o início de suas atividades diárias.

Contudo, os organismos animais necessitam estar sempre prontos a se adaptarem ao dia astronômico, que na maioria das regiões do globo, tem a duração de seus períodos de luz e escuridão progressivamente alterados ao longo do ano.

Dentro deste contexto, o núcleo hipotalâmico supraquiasmático exerce papel central ao receber informações da variação da luminosidade diária e transformar, via sistema nervoso simpático, essas informações em sinais endócrinos, através da estimulação da secreção adrenal de glicocorticoides.

Os glicocorticoides, de modo sincrônico ao estímulo do sistema nervoso central, aumentam e diminuem ao longo do dia sinalizando às células do corpo o momento de ativarem processos anabólicos indispensáveis e alterarem seu comportamento para o exercício de suas atividades diárias, bem como terem definidos seus períodos de repouso e catabolismo.

REFERÊNCIAS

1. Flores DEFL. Investigando a sincronização fótica na natureza. *Rev Biol.* 2012; 9: 7–12.
2. Hastings MH, Herzog ED. Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Rhythm.* 2004;19(5):400-13.
3. Sharp DC. Melatonin. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. *Equine Reproduction*, 2nd Ed. Willey-Blackwell, 2011. p.1969-1978.
4. Barclay JL, Tsang AH, Oster H. Interaction of central and peripheral clocks in physiological regulation. In: Kalsbeek A, Meroz M, Roenneberg T, Foster RG. *Progress in Brain Research*, Elsevier, Netherland, 2012. 199:163-181.
5. Aschoff J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Sym.* 1960; 25:11-28.
6. Enright JT. Ecological aspects of endogenous rhythmicity. *Annu Rev Ecol Syst.* 1970; 1:221-238.
7. Ota T, Fustin JM, Yamada H, Doi M, Okamura H. Circadian clock signals in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 349:30–37.
8. Lin AN, Paget SA *Principles of Corticosteroid Therapy*. Hodder Arnold Publication, New York; 2002. p. 330.
9. Funder JW. Aldosterone and mineralocorticoid receptors: past, present, and future. *Endocrinology.* 2010; 151:5098–5102.
10. Fawcett DW. Bloom and Fawcett a Textbook of Histology, 12th ed. Chapman and Hall, New York; 1994. p. 988.

- 303 11.Kamperis K, Hagstroem S, Radvanska E, Rittig S, Djurhuus JC. Excess diuresis and
304 natriuresis during acute sleep deprivation in healthy adults. *Am J Physiol Renal Physiol.*
305 2010; 299:404–411.
- 306 12.Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G,
307 Schibler U. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling.
308 *Science.* 2000; 289:2344–2347.
- 309 13.Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FRA, Loudon ASI. Posttranslational mechanisms
310 regulate the mammalian circadian clock. *Cell.* 2001; 107(7):855–867.
- 311 14.Hardin P E. Transcription regulation within the circa- dian clock: The E-box and beyond. *J*
312 *Biol Rhythm.* 2004; 19(5):348–360.
- 313 15.Zhang EE, Kay SA. Clocks not winding down: Unravelling circadian networks. *Nat Rev*
314 *Mol Cell Biol;* 2010. 11(11):764–776.
- 315 16.Green CB, Takahashi JS, Bass J. The meter of metabolism. *Cell.* 2008; 134:728–742.
- 316 17.Okamura H, Doi M, Fustin JM, Yamaguchi Y, Matsuo M. Mammalian circadian clock
317 system: molecular mechanisms for pharmaceutical and medical sciences. *Adv Drug Deliv*
318 *Rev.* 2010; 62:876–884.
- 319 18.Schibler U, Sassone-Corsi P. A web of circadian pacemakers. *Cell.* 2002; 111:919–922.
- 320 19.Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H.
321 Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science.* 2003; 302:1408-
322 1412.
- 323 20.Henley DE, Leendertz JA, Russell GM, Wood SA, Taheri S, Woltersdorf WW, Lightman
324 SL. Development of an automated blood sampling system for use in humans. *J Med Eng*
325 *Technol.* 2009; 33:199–208.
- 326 21.Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following
327 suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 1972; 42:201–206.
- 328 22.Carsia RV, Harvey S. Adrenals. In: Whittow GC. (ed): *Sturkie's Avian Physiology*, (ed. 5).
329 San Diego, CA, Academic Press; 2000. p.489-537.
- 330 23.Romero LM. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living
331 vertebrates. *Gen Comp Endocr.* 2002; 128:1–24.
- 332 24.Boonstra R. Coping with changing northern environments: the role of the stress axis in birds
333 and mammals. *Integr Comp Biol.* 2004; 44:95–108.
- 334 25.Romero LM. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends Ecol*
335 *Evol.* 2004; 19:249–255.
- 336 26.Ottenweller JE, Meier AH, Ferrell BR, Horseman ND, Proctor A. Extrapituitary regulation
337 of the circadian rhythm of plasma corticosteroid concentration in rats. *Endocrinology.* 1978;
338 103:1875–1979.
- 339 27.Ottenweller JE, Meier AH. Adrenal innervation may be an extrapituitary mechanism able to
340 regulate adrenocortical rhythmicity in rats. *Endocrinology.* 1982; 111:1334–1338.
- 341 28.Edwards AV, Jones CT. The effect of splanchnic nerve stimulation on adrenocortical activity
342 conscious calves. *J Physiol.* 1987; 382:385–396.
- 343 29.Edwards AV, Jones CT. Autonomic control of adrenal function. *J. Anat.* 1993;183: 291–307.
- 344 30.Wright Jr KP, Czeisler CA. Absence of circadian phase resetting in response to bright light
345 behind the knees. *Science.* 2002; p.297-571.

- 346 31. Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yamamoto S, Takekida S, Yan L, Tei H, Moriya T, Shibata S,
347 Loros JJ, Dunlap JC, Okamura H. Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is
348 associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell*. 1997; 91:1043–1053.
- 349 32. Ishida A, Mutoh T, Ueyama T, Bando H, Masubuchi S, Nakahara D, Tsujimoto G, Okamura
350 H. Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release.
351 *Cell Metab*. 2005; 2:297–307.
- 352 33. Buijs RM, Wortel J, Van Heerikhuize JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, Romijn HJ, Kalsbeek
353 A. Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus
354 adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci*. 1999; 11:1535–1544.
- 355 34. Klein DC, Moore RY, Reppert SM. *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. Oxford
356 University Press, New York; 1991.
- 357 35. Gwinner E, Schwabl-Benzinger I, Schwabl H, Dittami J. Twenty-four-hour melatonin
358 profiles in a nocturnally migrating bird during and between migratory seasons. *Gen Comp*
359 *Endocr*. 1993; 90:119-124.
- 360 36. Fernandes RMF. O Sono Normal, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2006. In:
361 *Simpósio: Distúrbios Respiratórios do Sono*; 2006. 39:157-168.
- 362 37. Martinez D, Lenz MCS, Menna-Barreto L. Diagnóstico dos transtornos do sono relacionados
363 ao ritmo circadiano. *J Bras Pneumologia*. 2008; 34(3):173-180.
- 364 38. Lundberg U. Stress hormones in health and illness: The roles of work and gender.
365 *Psychoneuroendocrinol*. 2005; 30:1017–21.